



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PEDRO PINTO FERREIRA BRASILEIRO

**AUTORREGENERAÇÃO DE BIOCONCRETOS: investigação do potencial
microbiológico e determinação da etapa limitante na biomineralização de
carbonato de cálcio**

Recife

2023

PEDRO PINTO FERREIRA BRASILEIRO

AUTORREGENERAÇÃO DE BIOCONCRETOS: investigação do potencial microbiológico e determinação da etapa limitante na biomineralização de carbonato de cálcio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a defesa de Doutorado em Engenharia Química.

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo

Orientador: Prof. Dr. Mohand Benachour

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Yana Batista Brandão

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

B823a Brasileiro, Pedro Pinto Ferreira.
Autorregeneração de bioconcretos: investigação do potencial microbiológico e determinação da etapa limitante na biomineralização de carbonato de cálcio / Pedro Pinto Ferreira Brasileiro, 2023.
164 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo.

Orientador: Prof. Dr. Mohand Benachour.

Coorientadora: Profa. Dra. Yana Batista Brandão.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Recife, 2023.
Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Engenharia química. 2. Bacillus. 3. Sistema em cascata para biomineralização em cimento. 4. Impressão 3D. 5. Taxa de produção. I. Sarubbo, Leonie Asfora (Orientadora). II. Benachour, Mohand (Orientador). III. Brandão, Yana Batista (Coorientadora). IV. Título.

UFPE

660.2 CDD (22. ed.)

BCTG / 2023 - 140

PEDRO PINTO FERREIRA BRASILEIRO

AUTORREGENERAÇÃO DE BIOCONCRETOS: investigação do potencial microbiológico e determinação da etapa limitante na biomineralização de carbonato de cálcio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a defesa de Doutorado em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 31/05/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Andréa Fernanda de Santana Costa (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Celmy Maria Bezerra de Menezes Barbosa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Cesar Augusto Moraes de Abreu (Examinador Interno e Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mucio Luiz Banja Fernandes (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Freire Soares da Silva (Examinadora Externa)
Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar forças para continuar principalmente em épocas de pandemia.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo curso de Doutorado em Engenharia Química, em nome do Reitor Alfredo Gomes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) por proporcionar um excelente espaço para pesquisa e pelos equipamentos, em nome do Reitor Padre Pedro Rubens.

Ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI) pelo moderno espaço para pesquisas, pelos equipamentos e, principalmente, pelas pessoas de bom caráter que lá trabalham, em nome do Diretor-Presidente Guilherme Cardim Gouveia de Lima.

Aos meus queridos orientadores e coorientadora: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo por todo o acompanhamento na minha vida acadêmica e pela mágica condução na publicação acadêmica; Prof. Dr. Mohand Benachour, pelas proposições científicas de excelência para desenvolvimento de projetos de PD&I e Prof^a. Dr^a. Yana Batista Brandão pela ideia maravilhosa do projeto de pesquisa.

Aos meus amados pais, Gil Mendonça Brasileiro e Maria Regina Davina Pinto Ferreira, pela criação, incentivo e amor que sempre me deram. À minha amada irmã, Maria Carolina Brasileiro pela parceria inigualável para enfrentar e compartilhar os problemas e as alegrias do dia a dia. Aos meus tios Gláucio Brasileiro e Gladys Brasileiro pelos aconselhamentos semanais, à minha prima querida Luciana Brasileiro, ao meu afilhado Matheus Brasileiro e a todos os meus familiares.

Aos meus amigos Tiago Nogueira, Henrique Amorim, Maurício Pessoa de Melo, Viviane Correia, Thaís Corrêa, Bruno Roque, Rita Freire, Alexandre Paredes, Haline Bachmann e demais.

RESUMO

O cimento é o material mais utilizado do mundo, possibilitando a construção de edifícios, pontes, estradas e outras obras. A falta de manutenção, no entanto, causa um perigo de desabamento dessas estruturas, podendo ocasionar lesões ou até mortes de pessoas. Ademais, o ritmo acelerado das construções induz uma produção maior de cimento, potencializando a produção de gases de efeito estufa. No sentido de reverter essa situação, pesquisas estão sendo desenvolvidas para recuperação de estruturas de concreto, que utilizam o cimento como base, através de bactérias biomineralizadoras, os quais transformam lactato de cálcio em carbonato de cálcio para que as fissuras possam ser restauradas. Neste trabalho, foram utilizadas as bactérias *Bacillus cereus* (UCP 1615), *Bacillus methylotrophicus* (UCP 1616) e *Bacillus subtilis* (UCP 0999) para determinar as melhores condições de produção de bioconcretos nos tipos de cimento: CP II-E, CP II-F e CP II-Z. Experimentos iniciais foram realizados com as três espécies de bactérias no cimento mais comercializado (CP II-Z) e a partir da seleção da bactéria que mais produziu pseudocristais, esta foi aplicada nos três tipos de cimento citados. A partir das dificuldades para produção cristalina, um protótipo denominado de Sistema em Cascata para Biomineralização em Cimento (SCBC) foi construído, utilizando as ferramentas da impressão 3D e do microcontrolador Arduino UNO R3 para determinação da etapa limitante do processo de biomineralização com um planejamento fatorial para secagem e uma curva cinética para a bactéria *B. cereus*. Nos experimentos iniciais para seleção microbiana foram obtidos cristais de SiO_2 e CaCO_3 com difratogramas de raios X, indicando 82% dos picos para SiO_2 e 18% para calcita através da bactéria *B. cereus*. Os experimentos iniciais também indicaram uma afinidade entre a bactéria *B. cereus* e o cimento CP II-E. Os ensaios de planejamento experimental para secagem e cinética para a biorreação indicaram a secagem como a etapa limitante com uma taxa de produção de carbonato de $0,19 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$. Os estudos indicam potenciais resultados para autorregeneração de concretos a serem cicatrizados, reduzindo a necessidade de produção do componente tóxico cimento, sendo uma alternativa *ecofriendly* e reduzindo a emissão de gases de efeito estufa.

Palavras-chaves: *Bacillus*; sistema em cascata para biomineralização em cimento; impressão 3D; taxa de produção.

ABSTRACT

Cement is the most applied material in the world, enabling the construction of buildings, bridges, roads, and other utilities that favor the routine. However the lack of maintenance causes a danger of these structures collapsing, which can cause accidents or even deaths of people. In addition to the preventive factor, the fast pace of constructions induces a raising of cement production, consequently emitting more CO₂ to atmosphere and potentiating the production of this greenhouse gas on the planet. In order to reverse this situation, researches are being carried out to recover concrete structures, which uses cement as agglomerating agent, through biomineralizing microorganisms. These microorganisms convert calcium lactate into calcium carbonate. In this work, there was proposed a study of the bacteria *Bacillus cereus* (UCP 1615), *Bacillus methylotrophicus* (UCP 1616) and *Bacillus subtilis* (UCP 0999) to determine the best bioconcrete production conditions in the types of cement: CP II-E, CP II-F, and CP II-Z. First experiments were carried out with the three species of bacteria in the most commercialized cement (CP II-Z). Initial experiments also indicated a collection between the bacteria *B. cereus* and the CP II-E cement. A prototype called Cascade System for Biomineralization in Cement (CSBC) was built, using tools as 3D printing and Arduino UNO R3 microcontroller to control the process. Input variables were temperature and air flow and an output variable was the difference between process and environment humidities. The previous experiments indicated crystals of SiO₂ and CaCO₃ (calcite form) with X-ray diffractograms, indicating 82% of the peaks for SiO₂ and 18% for calcite through the bacterium *Bacillus cereus*. The CSBC presented a stability in the measurement of the humidities. Assays of experimental design for drying and assays kinetics for bioreaction indicated drying as the limiting phenomenon with a carbonate production rate of 0.19 mg·h⁻¹. The studies potentially indicate results for self-regeneration of concrete to be healed, reducing the need to produce the toxic component cement, being an ecological alternative and anxious the emission of greenhouse gases.

Keywords: *Bacillus*; cascade system for biomineralization in cement; 3D printing; production rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Redução do teor de vazios da mistura de agregados angulosos e arredondados com o aumento de agregados arredondados.....	22
Figura 2 –	Representação das regiões de insaturação e de supersaturação com a curva de solubilidade e o limite metaestável para um soluto e um solvente quaisquer.....	29
Figura 3 –	Teoria de nucleação primária de um cristal.....	30
Figura 4 –	Fluxograma da tese.....	42
Figura 5 –	Fluxograma de engenharia de processos do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	46
Figura 6 –	Desenho de célula do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	47
Figura 7 –	Peça de metade de um pulmão projetada para impressão 3D.....	48
Figura 8 –	Esquematização do circuito elétrico para medição das umidades no ambiente e no Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	50
Figura 9 –	Projeto de minibetoneira em PETG para homogeneização de bioconcretos com corte radial.....	58
Figura 10 –	Início da formação cristalina através de <i>Bacillus cereus</i> com 17 h de produção.....	59
Figura 11 –	Formação pseudocristalina através de <i>Bacillus cereus</i> com 168 h de produção: (A) placa de petri inteira e (B) seção da placa de petri.....	60
Figura 12 –	Cristal produzido por <i>Bacillus cereus</i> após 168 h visto em microscópio ótico (20 mm).....	60
Figura 13 –	Padrões de difratogramas de raios x de: (A) cristais produzidos por <i>Bacillus cereus</i> em placas de cimento após 168 h e (B) fragmentos de bioconcreto encontrado por Lucas <i>et al.</i> (2018).....	61

Figura 14 –	Seleção de diferentes tipos de cimento para a bactéria <i>Bacillus cereus</i>	63
Figura 15 –	Placa de petri com indicações de pseudocristais no cimento CP II-E.....	63
Figura 16 –	Curva de solubilidade obtida dos dados de Visscher e Vanderdeelen (2011) para variações entre 5 e 35°C da calcita.....	64
Figura 17 –	Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	65
Figura 18 –	Células reacionais de PETG do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	66
Figura 19 –	Pulmão em: (A) modo impresso e (B) modo fixado e resinado.....	66
Figura 20 –	Célula reacional de vidro do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	67
Figura 21 –	Comparação de erros das diferenças entre umidades sem a ativação do compressor no Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.....	68
Figura 22 –	Ensaio 15 do planejamento fatorial de secagem.....	70
Figura 23 –	Resultados do tempo e da taxa de produção de carbonato de cálcio no planejamento fatorial de secagem.....	71
Figura 24 –	Diagrama de Pareto para o planejamento experimental de secagem.....	74
Figura 25 –	Gráficos de superfície de resposta tri e bidimensionais com as variações entre temperatura e aeração 3D (A) e 2D (B), entre concentração de carbonato de cálcio e aeração 3D (C) e 2D (D) e entre temperatura e concentração de carbonato de cálcio 3D (E) e 2D (F).....	75
Figura 26 –	Taxas de produção de carbonato de cálcio no planejamento experimental de secagem previstas e observadas.....	76
Figura 27 –	Varreduras entre as absorbâncias de soluções de 5000 mg·L ⁻¹ de carbonato de cálcio e lactato de cálcio.....	77

Figura 28 –	Curva de calibração para análise de carbonato de cálcio em água.....	78
Figura 29 –	Células reacionais de vidro preparadas para a cinética da bactéria <i>Bacillus cereus</i>	79
Figura 30 –	Curva de crescimento microbiano da bactéria <i>Bacillus cereus</i> com (A) a massa de carbonato de cálcio, o pH e a biomassa e (B) a taxa de produção de carbonato de cálcio.	80
Figura 31 –	Tubo de Falcon contendo (A) solução centrifugada e (B) biomassa após retirada do sobrenadante.....	81
Figura 32 –	Biomassa residual às (A) 24 e (B) 120 h de cinética.....	81
Figura 33 –	Minibetoneira: (A) impressão em 3D e (B) conexão das partes.....	85
Figura 34 –	Minibetoneira: (A) visão tridimensional e (B) visão lateral....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Matriz de níveis para secagem de carbonato de cálcio.....	52
Tabela 2 –	Matriz de experimentos para secagem de carbonato de cálcio.....	52
Tabela 3 –	Preparo de soluções para determinação da curva de calibração de carbonato de cálcio.....	54
Tabela 4 –	Efeitos estimados para planejamento fatorial de secagem de soluções de carbonato de cálcio.....	72
Tabela 5 –	Análise de variância para planejamento fatorial de secagem de soluções de carbonato de cálcio.....	72
Tabela 6 –	Ensaio de absorvância de acordo o preparo de soluções....	78

LISTA DE SIGLAS

ABS	Acrilonitrila-Butadieno-Estireno
A	Aeração
AG	Agregados Graúdos
AM	Agregados Miúdos
$C_{\text{Carbonato}}$	Concentração de Carbonato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
CP	Cimento Portland
DRX	Difratometria de Raios X
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
$m_{\text{Carbonato}}$	Massa de Carbonato (g)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PETG	Polietileno Tereftalato de Etileno Glicol
PLA	Poliácido Láctico
SCBC	Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	Tempo (h)
$TP_{\text{Carbonato}}$	Taxa de Produção de Carbonato de Cálcio ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	COMPOSIÇÃO DO CONCRETO.....	18
2.1.1	Cimento	18
2.1.2	Agregados miúdos e graúdos	21
2.1.3	Água	22
2.1.4	Tipos de concreto	23
2.2	CONCRETOS AUTORREGENERÁVEIS.....	23
2.2.1	Microencapsulamento	24
2.2.2	Agentes cicatrizantes	25
2.2.3	Biomíneralização	25
2.3	CURVAS DE SOLUBILIDADE E CRISTALIZAÇÃO.....	27
2.4	CARACTERIZAÇÕES DO CONCRETO AUTORREGENERADO.....	32
2.5	CONCRETOS AUTORREGENERÁVEIS E SISTEMAS AFINS EM PATENTES.....	34
2.6	CONCRETOS AUTORREGENERÁVEIS E SISTEMAS AFINS EM PERIÓDICOS.....	36
2.7	IMPRESSÃO 3D.....	37
2.8	ARDUINO.....	38
2.9	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	MICRO-ORGANISMOS E CIMENTOS.....	43
3.2	EXPERIMENTOS INICIAIS.....	43
3.2.1	Seleção de micro-organismos	43
3.2.2	Seleção de tipos de cimento	44
3.3	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA CALCITA.....	44
3.4	SISTEMA EM CASCATA PARA BIOMINERALIZAÇÃO EM CIMENTO (SCBC).....	45

3.4.1	Etapa de engenharia de processo.....	45
3.4.2	Etapa instrumental, elétrica e de programação.....	49
3.4.3	Planejamento fatorial para secagem do carbonato de cálcio.....	51
3.4.4	Varredura do comprimento de onda e determinação da curva de calibração do carbonato de cálcio.....	53
3.4.5	Cinética de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> no SCBC.....	55
3.4.6	Determinação da etapa limitante através da taxa de produção de carbonato de cálcio.....	57
3.5	CONSTRUÇÃO DE PROTÓTIPO DE MINIBETONEIRA PARA HOMOGENEIZAÇÃO DOS BIOCONCRETOS.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1	EXPERIMENTOS INICIAIS.....	59
4.1.1	Seleção de micro-organismos.....	59
4.1.2	Seleção de tipos de cimento.....	62
4.2	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA CALCITA.....	64
4.3	SISTEMA EM CASCATA PARA BIOMINERALIZAÇÃO EM CIMENTO.....	64
4.3.1	Etapa de engenharia de processo.....	65
4.3.2	Etapa instrumental, elétrica e de programação.....	68
4.3.3	Planejamento fatorial para secagem do carbonato de cálcio.....	70
4.3.4	Varredura do comprimento de onda e determinação da curva de calibração do carbonato de cálcio.....	76
4.3.5	Cinética de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> no SCBC.....	79
4.3.6	Determinação da etapa limitante através da taxa de produção de carbonato de cálcio.....	84
4.4	CONSTRUÇÃO DE PROTÓTIPO DE MINIBETONEIRA PARA HOMOGENEIZAÇÃO DOS BIOCONCRETOS.....	84
5	CONCLUSÕES.....	86
5.1	CONCLUSÃO.....	86
5.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88

APÊNDICE A – DADOS DO DIFRATOGRAMA OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS INICIAIS DA SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM PLACAS CIMENTÍCIAS DO <i>Bacillus cereus</i>	95
APÊNDICE B – PROGRAMAÇÃO DA PLACA DE ARDUINO PARA O SISTEMA EM CASCATA PARA BIOMINERALIZAÇÃO DE CONCRETO.....	122
APÊNDICE C – DADOS DAS ABSORBÂNCIAS DAS SOLUÇÕES A 5000 mg·L ⁻¹ DE CARBONATO DE CÁLCIO E LACTATO DE CÁLCIO.....	125
APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO NA CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS (https://doi.org/10.3303/CET2079017).....	127
APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO NA BIOINTERFACE RESEARCH IN APPLIED CHEMISTRY (https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1470914725).....	133
APÊNDICE F – ARTIGO PUBLICADO NA ENERGIES (https://doi.org/10.3390/en15145262).....	150
ANEXO A – DADOS OBTIDOS DE VISSCHER E VANDERDEELEN (2011) PARA AS SOLUBILIDADES DA CALCITA.....	163

1 INTRODUÇÃO

A urbanização tem como um dos marcos a intensa quantidade de prédios, avenidas, pontes, viadutos e uma gama de construções como ferramentas facilitadoras do cotidiano. Um dos grandes imbróglios, no entanto, é a formação de rachaduras nessas edificações que podem resultar em situações drásticas e até fatais para quem convive nos centros urbanos. No intuito de remediar essa situação, concretos com capacidade autorregenerativa estão sendo estudados mediante o auxílio da biotecnologia (NAIN *et al.* 2019).

Um concreto comum apresenta a composição de cimento e água como agentes aglomerantes e agregados miúdos e graúdos como elementos responsáveis em maior parte pela rigidez do concreto. O cimento tem uma variedade de composições, apesar da dificuldade de serem encontradas todas as classificações no mercado, e corresponde à mistura mais consumida no mundo diante da grande quantidade de obras. Um dos maiores problemas do cimento é a toxicidade causada pelo material particulado, contendo dióxido de silício, prejudicando principalmente os trabalhadores das indústrias. Logo, o antagonismo de maior consumo e elevada toxicidade do cimento precisa ser reduzido (NEVILLE, 2016).

A hidratação e a secagem desse cimento misturado aos agregados miúdos e graúdos em proporções adequadas possibilita uma durabilidade de um concreto em condições normais. O intemperismo e as ações antrópicas, todavia, causam falhas internas e externas nesse concreto, necessitando de mecanismos para reestruturá-lo. Nesse sentido, as bactérias do gênero *Bacillus* estão sendo utilizadas para adsorverem-se na matriz do concreto, reagirem com substâncias como sais orgânicos de cálcio e sintetizarem compostos inorgânicos como o carbonato de cálcio com a finalidade de autorregenerar as falhas existentes no concreto. Esse fenômeno conhecido como biomineralização também está presente, por exemplo, nas ostras, onde a presença de um parasita no interior das conchas propicia a formação das pérolas (ZHANG *et al.* 2019).

O lactato de cálcio é um sal orgânico que representa um dos mecanismos para essa biomineralização com uma maior segurança, pois as vias metabólicas pela ureia e por outros compostos nitrogenados para a produção do CaCO_3 induzem a síntese de ácido nítrico, responsável pela corrosão em estruturas de concreto armado, por exemplo (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

As bactérias ao sintetizarem o carbonato começam a criar estruturas cristalinas, preenchendo os poros e as falhas advindas dos fenômenos naturais e antrópicos. Esses cristais podem ser avaliados quanto às propriedades microscópicas através de técnicas como a Microscopia Eletrônica de Varredura, a Análise Termogravimétrica e a Difractometria de Raios X. Em contrapartida, as resistências à compressão, tração e flexão e os ensaios em cimento como tempo de pega, expansibilidade e consistência da pasta são ensaios macroscópicos que determinam características essenciais para sintetizar novos tipos de bioconcreto (MORS; JONKERS, 2017; SIDDIQUE *et al.* 2017).

A impressão 3D é uma ferramenta que auxilia na construção de protótipos pela imensurável quantidade de possibilidades alcançadas. As distintas geometrias a serem criadas, as diferentes formas de extrusão da qualidade de um material, os variados tipos de materiais e os heterogêneos métodos de criação de uma peça tornam essa tecnologia um campo extraordinário para o desenvolvimento de projetos de pesquisa. Tudo o que é necessário são a criatividade na elaboração da peça, a padronização através de normas vigentes de equipamentos sub ou superescalados e um pós-processamento efetivo para tornar um processo com peças de impressão 3D exequível (PORTANGUEN *et al.* 2019).

A construção de um protótipo sem uma autonomia pode gerar os denominados erros humanos, os quais inviabilizam um estudo aprofundado de um processo pela baixa repetibilidade de execução das ações. Os controladores de baixo custo e de código aberto como o *Arduino Uno R3* são ferramentas essenciais para comandar as ações em um protótipo, dispendo de um vasto material de programação, de uma ampla quantidade de sensores e atuadores compatíveis e de atualizações de software periódicas e gratuitas (CAI *et al.* 2019).

Um projeto como a autorregeneração de bioconcretos pode ser executado com toda a teoria sólida sobre os materiais e as reações químicas e com protótipos altamente sofisticados e automatizados, mas se não houver o mínimo de estratégia estatística nos métodos, os melhores resultados provavelmente não irão aparecer. Nesse sentido, os planejamentos fatoriais compõem uma estrutura organizacional bem definida para a realização dos experimentos e otimização dos resultados. As diferentes técnicas estatísticas permitem reunir a teoria com a prática para estudar os efeitos mais adequados de variáveis de entrada sobre variáveis de saída. Ademais,

os delineamentos sequenciais permitem perceber o sinergismo e o antagonismo de variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A autorregeneração de bioconcretos, portanto, é fundamental para a redução do uso de cimento pela elevada toxicidade, gerando uma aplicação *ecofriendly*, e para a reestruturação de falhas em construções. Logo, a união do entendimento sobre a biomineralização; da construção de peças tridimensionais; da automação de protótipos e dos planejamentos fatoriais tornam o projeto em destaque para ser alvo de investigações científicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Determinar a etapa limitante para biomineralização de carbonato de cálcio entre bactérias do gênero *Bacillus*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Testar a eficácia de diferentes espécies de bactérias (*Bacillus cereus*, *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus subtilis*) e diferentes tipos de cimento (CP II-E, CP II-F e CP II-Z) para entender quais as limitações do processo de biomineralização por lactato de cálcio.
- Buscar alternativas para suprir as limitações e possibilitar um estudo da etapa limitante do processo através do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento.
- Realizar um planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a fim de estudar as taxas de produção de carbonato de cálcio para a cristalização.
- Avaliar a cinética da biorreação química para síntese de carbonato de cálcio.
- Determinar a etapa limitante para as condições estudadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Edifícios, viadutos, pontes e diversas construções requerem a rigidez propiciada pelo concreto. Não obstante a sólida composição desse material, rachaduras são comuns com o passar dos anos por ações intempéricas e antrópicas seguidas de uma intrínseca relação entre a proporção dos constituintes do concreto e a aplicabilidade adequada, podendo causar desde desmoronamentos de estruturas até lesões e mortes. Neste sentido, é preciso avaliar quais os materiais são os mais adequados para relacionar a composição do concreto com a eficaz aplicabilidade (NEVILLE, 2016).

2.1. COMPOSIÇÃO DO CONCRETO

A matriz do concreto é constituída basicamente por 4 componentes: água, cimento, agregados miúdos e sólidos graúdos (BRITO; KURDA, 2021).

Os dois primeiros componentes são, respectivamente e simplesmente, os dois maiores compostos utilizados no mundo. Segundo Shanks *et al.* (2019), o cimento tem uma produção de cerca de 4 bilhões de toneladas ao ano, equivalendo a uma utilização de 560 kg por pessoa por ano. Esses dois componentes são essenciais no processo de ligação da matriz do concreto pela formação de uma pasta cimentícia, pois a água e o cimento apresentam a característica de aderência tanto ao resto dos componentes, quanto à superfície na qual vão ser aplicados. A paridade entre a água e o cimento é tamanha que se denomina cimento hidráulico todo aquele cimento que reage com a água e endurece posteriormente.

Se por um lado a água e o cimento refletem a característica de adesão, os agregados miúdos e graúdos são incorporados na matriz do concreto para aumentar a rigidez do material, variando-se a forma e a proporção dos grânulos (NEVILLE, 2016).

2.1.1 Cimento

A produção deste agente aglomerante inicia-se nas minas de calcário, onde alguns pontos da mina são estudados para identificar os possíveis locais de extração do mineral através de técnicas de caracterização como a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Difractometria de Raios X (DRX). Essas técnicas auxiliam a comparação do material analisado com perfis cristalinos para, em caso de uma elevada similaridade, serem detonados explosivos nas minas com o intuito de

segregar os materiais até um tamanho mínimo suficiente (a variar com cada tipo de indústria). Dessarte, as pedras de calcário são transportadas até as fábricas costeiras às minas via esteiras de grandes dimensões com as finalidades de redução do custo e celeridade de aquisição dos minerais (SINGH; SUBRAMANIANM, 2019).

Nas fábricas, é viável uma segunda amostragem do material coletado para fins de caracterização no intuito de avaliar se o mineral é realmente aquele investigado *a priori*, evitando custos por possíveis erros humanos. Após a efetiva extração do mineral, as pedras de calcário são armazenadas em silos para a ulterior mistura com minério de ferro e argila (silicatos de alumínio, ferro e magnésio) e moagem, formando o que se denomina de “farinha”. A depender do tipo de cimento as proporções da farinha são variadas, permitindo diferentes aplicações com diferentes composições. Essa farinha passa, então, para um processo de pré-aquecimento, denominado de pré-calcinação, onde o calor é aplicado sob uma temperatura de cerca de 1000°C, um pouco maior para a decomposição do CaCO_3 em CaO e CO_2 . Alguns dos diferentes tipos de argila são materiais refratários por suportarem temperaturas de mais de 1500°C, podendo vitrificar em torno de 1300°C. Por isso, após a maior eliminação dos gases na pré-calcinação, a farinha é submetida a um aquecimento de 1000 até 1450°C em um forno rotativo e contínuo, permitindo a formação de uma mistura denominada de clínquer. Esse é o principal processo de toda indústria cimentícia, tanto que a manutenção deste equipamento é realizada poucas vezes ao ano (SINGH; SUBRAMANIANM, 2019).

Uma das grandes celeumas ambientais para esses tipos de fornos é a elevada produção de CO_2 , perfazendo cerca de 5-7% da emissão de gás carbônico mundial e 1% para o Reino Unido. Apenas o consumo da eletricidade utilizada compõe 10% da emissão de CO_2 de um processo de produção de cimento. Esses dados refletem, porquanto, que a fabricação de cimento causa um aumento dos gases de efeito estufa tanto por um viés energético, quanto por um viés reacional (SHANKS *et al.* 2019).

O clínquer após sair dos fornos é misturado com diversos materiais: o gesso (com a maior composição de CaSO_4), sendo o agente responsável pelo tempo de endurecimento do cimento, ou também denominado de tempo de cura; a escória (SiO_2 com outros óxidos), sendo um reaproveitamento da indústria metalúrgica; o calcário (CaCO_3) em pó sem aquecimento como uma alternativa sustentável e de mais baixo custo para a indústria; a pozolana (rica em silicatos) que apresenta uma elevada

resistência à corrosão diante da elevada alcalinidade e o fíler (CaCO_3), sendo um fino pó para melhorar a trabalhabilidade do cimento (BRITO; KURDA, 2021).

É percebido, então, que a composição do cimento apresenta diversos tipos de óxidos, principalmente o SiO_2 ; ânions como o carbonato e o sulfato e cátions como o cálcio, o magnésio, o ferro e o alumínio.

Todo este processo de fabricação compõe usualmente a produção do cimento denominado de Portland, em homenagem a uma ilha britânica com o referido nome. No Brasil, a norma técnica NBR 16697 traz a unificação de antigas normas que regulamentavam a especificação da composição dos tipos de cimento Portland, apresentando-se como siglas para esta especificação (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2018a). Essas siglas são divididas em até 4 partes: a) a referência “CP” para identificar que aquele cimento é do tipo Portland; b) um subtipo do cimento que varia conforme a composição-base, podendo ser dos tipos I (comum), II (composto), III (de alto forno), IV (pozolânico) ou V (de alta resistência inicial); c) aditivos à composição-base que podem ser E (escória de alto forno), F (fíler) e Z ou S (material pozolânico) e d) a resistência em MPa após 28 dias, quando submetido à mínima compressão de 25, 32 ou 40 MPa. Logo, um cimento “CP II-Z 32”, por exemplo, significa que é um cimento Portland composto com material pozolânico e resistente à compressão mínima de 32 MPa.

Os subtipos de cimento apresentam algumas características específicas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2018a):

- I) Cimento Comum (CP I): uma mistura com pelo menos 95% de clínquer com uma ou mais de uma forma de sulfato de cálcio (gesso). Esse tipo de cimento é aplicado no intuito de retardar o tempo de pega do cimento e com uma variação de aditivos pozolânicos (CP I-S) para diminuir a permeabilidade e a corrosão.
- II) Cimento Composto (CP II): uma máxima mistura de clínquer com sulfatos de cálcio de até 94%, apresentando variações E, F e Z para respectivamente ter um menor desprendimento de calor, uma maior trabalhabilidade pelo fino pó do fíler e diminuir a permeabilidade.
- III) Cimento de Alto Forno (CP III): é um cimento aplicado em obras onde existe uma necessidade de mais resistência, a exemplos de esgotos e barragens com uma grande quantidade de escória (silicatos).

- IV) Cimento Pozolânico (CP IV): a maior presença das pozolanas reduz a corrosão e a permeabilidade.
- V) Cimento de Alta Resistência Inicial (CP V): é um cimento que praticamente não contém aditivos com raras exceções, garantindo uma resistência inicial maior desde o 1º dia.

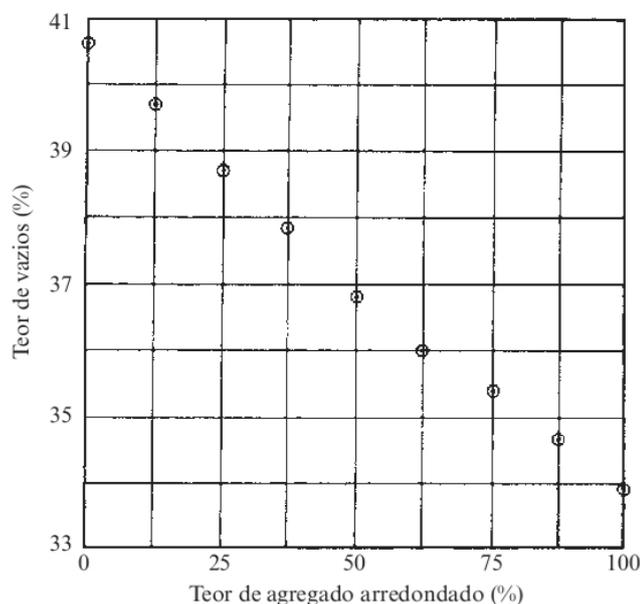
2.1.2 Agregados miúdos e graúdos

Usualmente denominados de areia, a composição a partir de 75% em massa de agregados miúdos e graúdos no concreto é um fator essencial em avaliação, haja vista que, apesar de não serem reativos quimicamente, apresentam características mecânicas e térmicas, as quais seguramente influenciam no desempenho do concreto. Os agregados são definidos em miúdos para grãos com dimensão inferior a 4,75 mm e em graúdos para grãos maiores do que 75 mm (NEVILLE, 2016).

O tamanho dos grânulos é de suma importância na determinação dos agregados, pois determina a forma em que os grânulos podem ser dispostos em um volume qualquer, afetando características como porosidade, densidade e resistência. Essas e as demais propriedades petrográficas advêm principalmente das características da rocha-matriz donde os agregados foram fragmentados por ações naturais do intemperismo ou antrópicas. Logo, há uma espécie de mimetismo de propriedades dos agregados diante da rocha-matriz. Como exemplos de agregados miúdos: a areia apresenta dimensões entre 60 e 70 μm e o silte tem uma granulometria entre 2 e 60 μm . Para os agregados graúdos, utiliza-se frequentemente a brita, podendo ser basalto, calcário, gnaisse ou granito (NEVILLE, 2016).

A forma dos agregados também pode variar em: arredondado, irregular, lamelar, anguloso, alongado e lamelar-alongado. Na Figura 1, é notória a preferível utilização de agregados arredondados numa mistura de agregados angulosos e arredondados, pois o volume preenchido pelo ar será menor. Isso significa que para uma similar massa de cimento, água, agregados miúdos e agregados graúdos, poderão existir dois volumes diferentes de concreto a depender da forma dos agregados, concentrando e diluindo os componentes e aumentando e reduzindo as propriedades do concreto (NEVILLE, 2016).

Figura 1 – Redução do teor de vazios da mistura de agregados angulosos e arredondados com o aumento de agregados arredondados



Adaptado de Neville (2016)

No concreto, as diferentes proporções de cimento (C), agregado miúdo (AM) e agregado graúdo (AG) formam o denominado traço do concreto, o qual pode ser representado como: “C:AM:AG”. Se for utilizado um traço de concreto, por exemplo 1:2:3 em massa, significa que são uma parte de cimento, duas partes de agregado miúdo e três partes de agregado graúdo.

É interessante perceber que segundo a NBR 7214, a areia utilizada para o concreto tem como requisito uma percentagem igual ou maior do que 95% de sílica. Se fosse utilizado o exemplo de traço anterior juntamente com um cimento CP III (alta concentração de silicatos), o concreto teria mais da metade de SiO_2 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2015).

2.1.3 Água

O solvente universal é de suma importância no concreto por ser o componente responsável por reagir com o cimento e causar *a posteriori* o endurecimento do concreto. A água é tão importante para a composição do concreto que existe a denominada relação água/cimento, a qual é a divisão da massa de água pela massa de cimento utilizadas (HOVER, 2011).

Um pequeno teor de água na mistura com o cimento pode até reduzir o tempo de cura do concreto, conquanto não garante uma elevada estabilidade e um desempenho total que poderia ser alcançado. Em sentido contrário, um elevado teor

de água aumenta o tempo de cura do concreto, e este excesso de hidratação causa uma maior fragilidade no concreto (HOVER, 2011).

2.1.4 Tipos de concreto

O concreto apresenta uma ampla variedade de aplicações, sendo composto com dois dos componentes mais consumidos no mundo, (NEVILLE, 2016; CHICA; ALZATE, 2019). Consequentemente também apresenta uma gama de tipos. Destacam-se entre os tipos:

- convencional: é o concreto comum utilizado em obras;
- bombeável: é utilizado quando o transporte via bomba é requerido, aumentando-se a relação água/cimento;
- armado: é a aplicação do concreto convencional com barras de aço para aumentar os fatores de resistência mecânica, causando, no entanto, uma maior tendência à corrosão;
- protendido: similar ao concreto armado, é um concreto com espaços projetados para a inserção de cabos de aço, também garantindo uma maior resistência mecânica;
- projetado: consiste em jatos de concreto através de mangueiras com ar comprimido;
- leve: é um concreto com baixa massa específica indicado para acabamentos;
- pesado: é um concreto com elevada massa específica projetado para evitar a radiação;
- celular: é um concreto com aditivo de espuma utilizado para ser implantado em divisórias e
- autorregenerável: é um concreto que pode regenerar-se após sofrer intempéries e rachaduras.

2.2 CONCRETOS AUTORREGENERÁVEIS

Historicamente, as primeiras investigações sobre o concreto autorregenerável surgiram por volta do ano de 1836 pela Academia Francesa de Ciências; em 1956, foi identificada a formação cristalina com CaCO_3 e, em 1998, pesquisadores conseguiram recuperar cerca de 200 μm de uma fissura por este tipo de cura autogênica, refletindo

um grande avanço nos estudos químicos para a autorregeneração do concreto (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019; DANISH; MOSABERPANAH; SALIM, 2020).

A autorregeneração do concreto tem como parâmetros de qualidade: 1) a selagem efetiva da fissura; 2) a compatibilidade do material formado com a matriz de concreto; 3) um longo prazo de resistência; 4) uma pluralidade de melhorias na matriz do concreto e 5) a viabilidade sustentável. Todas essas características são fundamentais para obter-se um concreto com capacidade de cicatrização com excelência (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019; DANISH; MOSABERPANAH; SALIM, 2020).

A autorregeneração do concreto pode ocorrer nos modos autogênico e autônomo. A primeira forma incide sobre a hidratação dos componentes cimentícios, reagindo para formar carbonato de cálcio e, posteriormente, obstruindo as microfissuras presentes no concreto. Normalmente, é verificado que este processo de hidratação ocorre a partir de um pH acima de 7,5. O segundo modo apresenta uma autorregeneração estratégica, podendo ser através de sistemas vascularizados, os quais possibilitam a percolação de um fluido com um composto para a autorregeneração, ou de um sistema de microencapsulamento propiciando a liberação de um composto para a autorregeneração no momento adequado (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019; DANISH; MOSABERPANAH; SALIM, 2020).

2.2.1 Microencapsulamento

A tecnologia de microencapsulamento funciona segundo a máxima *lab-on-a-chip* (laboratório miniaturizado), isto é, a portabilidade de execução de um nicho de funções, onde existirão basicamente duas fases: uma dispersa e uma contínua. A primeira fase é sempre onde está inserido o agente responsável pela autorregeneração, o qual pode ser de três tipos: polimérico, biológico ou inorgânico. A segunda fase é o envoltório responsável pela proteção do agente de autorregeneração ante um meio reativo, permitindo um controle maior do instante onde haverá o rompimento da barreira para ocorrer o processo de autorregeneração do concreto (KANELLOPOULOS *et al.* 2017).

Normalmente, há dois métodos utilizados para o microencapsulamento: a geração de gotículas em microfluidos e a ligação cruzada (*cross-linking*). O primeiro método funciona basicamente com sistemas hidráulicos capilares como a junção em T, a focalização de fluxo e o fluxo concorrente, em que as pressões de entrada do

sistema permitem o microenglobamento da fase dispersa pela fase contínua. O segundo método é a densificação da fase contínua sobre a fase dispersa, isto é, a fase contínua líquida começa a geleificar até haver a proteção da fase dispersa, subdividindo-se este método em: sistemas térmicos, com polímeros de diferentes temperaturas de solução crítica; sistemas iônicos, com a comum aplicação do alginato de sódio para a geleificação da fase dispersa e sistemas fotoinduzidos com a aplicação de radiação ultravioleta sobre fotoiniciadores envolvidos por uma fotomáscara (ALKAYYALI *et al.* 2019).

Os sistemas iônicos, por exemplo, obtiveram um grande êxito na área médica com a integração da impressão 3D para criar um pequeno coração vascularizado através da deposição das células com alginato de sódio em uma solução de cloreto de cálcio (NOOR *et al.* 2019).

2.2.2 Agentes cicatrizantes

Os agentes cicatrizantes, conforme relatados, podem ser poliméricos, inorgânicos e biológicos, e a aplicação varia conforme as disponibilidades tecnológica e financeira. Dentre os agentes poliméricos, destacam-se o dicitlopentano e o metilmetacrilato; dentre os agentes inorgânicos, o silicato de sódio e óxido de magnésio e dentre os agentes biológicos as bactérias do gênero *Bacillus* (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

Os dois primeiros grupos apresentam a desvantagem de reagirem quimicamente em amplas faixas de temperatura e potencial hidrogeniônico. Essa amplitude é considerada uma desvantagem, pois a reação química para ser estagnada precisará ter um controlador energético, cessando a reação química. Em contrapartida, as bactérias do gênero *Bacillus*, além de apresentarem um pH ótimo neutro-alcalino, também possuem uma atividade metabólica delimitada a uma faixa restrita de temperatura, a qual varia conforme cada espécie (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

2.2.3 Biomineralização

Alguns seres vivos apresentam a capacidade da denominada biomineralização, a qual é o fenômeno da precipitação inorgânica proporcionado para alguma finalidade específica. Entre os exemplos, podem-se citar: a formação das conchas de moluscos para proteção a ataques de predadores; a produção de pérolas dentro das ostras

como uma reação natural aos parasitas, que buscam um local para reprodução, e a precipitação inorgânica via bacteriana como a produção de ouro ou de carbonato como um meio de nutrição. Ademais, alguns produtos microbianos como biossurfactantes podem auxiliar também no controle da biomineralização (BASTRZYK *et al.* 2019).

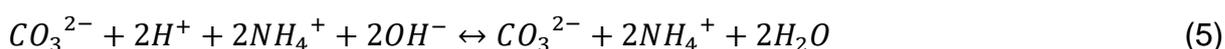
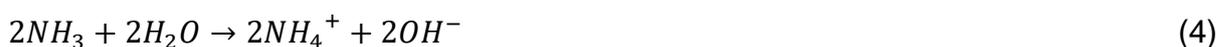
A precipitação do carbonato de cálcio pela via bacteriana vem sendo uma alternativa em estudo para a recomposição de concretos, em que uma bactéria consome o ânion de um sal orgânico de cálcio, dissociado e presente no cimento, e sintetiza o ânion carbonato. Este novo ânion é combinado com o cátion de cálcio, formando o carbonato de cálcio biomineralizado e reconstituindo as falhas do concreto (VIJAY; MURMU; DEO, 2017).

As vias para a biomineralização do carbonato de cálcio pelas bactérias do gênero *Bacillus* na autorregeneração do concreto advêm basicamente de 3 conjuntos de reações químicas, sendo nominadas em vias: ureolítica, por lactato e dinitrificante (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

A via ureolítica consiste inicialmente na transformação da ureia em ácido carbônico, segundo a Equação 1 e a Equação 2 (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

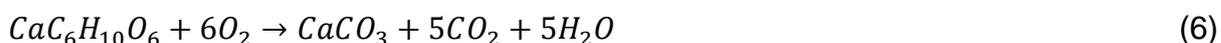


No equilíbrio, há a formação dos ânions hidroxila e carbonato e, conseqüentemente, o aumento do potencial hidrogeniônico, segundo a Equação 3, a Equação 4 e a Equação 5 (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

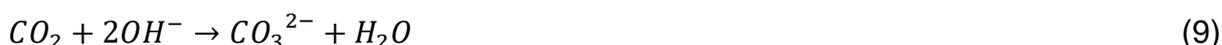
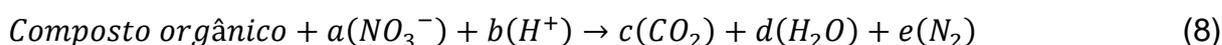


O grande problema desse caminho ureolítico é a transformação *a posteriori* do amônio em monóxido de nitrogênio, causando uma poluição ambiental, apesar de ser em menor nível em comparação às fontes comuns de poluição. Ademais, essa via pode converter o amônio em ácido nítrico aumentando a possibilidade de corrosão (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

A via por lactato de cálcio é mais segura e simples por ser a oxidação aeróbica do lactato de cálcio e combinação do hidróxido de cálcio para a síntese do carbonato de cálcio, de acordo com a Equação 6 e a Equação 7 respectivamente (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).



E a via por dinitrificação é uma redução do nitrato para o gás nitrogênio e consequente combinação do ânion carbonato formado com os íons de cálcio, segundo a Equação 8, a Equação 9 e a Equação 10 (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).



A hidrólise da ureia é o caminho mais rápido para a produção do carbonato de cálcio, conquanto nem sempre o caminho mais rápido é o mais adequado, haja vista os problemas de corrosão e poluição citados. Outrossim na via por dinitrificação, há uma possibilidade de transformação do nitrato em ácido nítrico e novamente ocorrerá a formação de um composto que pode acelerar a corrosão de um concreto armado, por exemplo. Uma similaridade nas três vias é a atração dos cátions de cálcio pela carga elétrica negativa da superfície bacteriana (SIDIQ; GRAVINA; GIUSTOZZI, 2019).

2.3 CURVAS DE SOLUBILIDADE E CRISTALIZAÇÃO

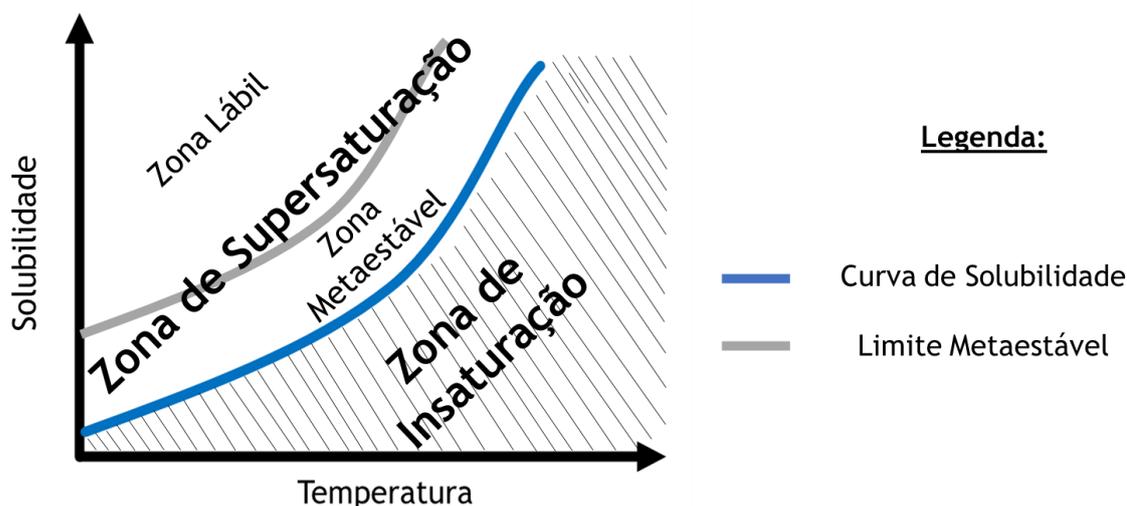
Uma molécula de sal, quando introduzida em um solvente puro, é dissociada em um cátion e um ânion pelas interações intermoleculares do solvente com o sal (soluto). À medida que mais moléculas desse sal são introduzidas no solvente, mais íons são formados até alcançar um limite onde as moléculas restantes do solvente não apresentem mais a energia necessária para romper as ligações intramoleculares do sal, precipitando assim o sal em excesso. Logo, cada soluto salino apresenta um potencial químico necessário para que haja a dissociação desse sal (GENCK *et al.* 2019).

Na prática, em vez de usar os potenciais químicos, utiliza-se uma quantidade (em massa) de um determinado sal para uma quantidade (em volume) de solvente.

Esses limites de solubilidade do sal são diferentes conforme as variações do soluto, do solvente, da pressão e da temperatura. Sob uma única pressão, esses limites são representados graficamente como as denominadas curvas de solubilidade, onde há a razão da quantidade (em massa) de um determinado soluto por 100 unidades (em volume) do solvente, variando com a temperatura. Alguns trabalhos citam também a razão da quantidade (em massa) de um determinado soluto por 1000 unidades (em volume) do solvente, variando com a temperatura. Curvas de solubilidade podem apresentar perfis com variações lineares ou exponenciais e com solubilidades diretamente (mais frequente) ou inversamente (mais raro) proporcionais à variação de temperatura. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dispõe de uma série de mais de 100 volumes de trabalhos com tabelas e curvas de solubilidade para auxiliar os pesquisadores a encontrarem a solubilidade mais adequada e mais confiável para as soluções (IUPAC, 2023). O comportamento do perfil da curva de solubilidade auxilia na escolha ideal para que haja a recuperação do soluto e/ou do solvente através da operação unitária denominada de cristalização – processo inverso da solubilização – que possibilita a formação de arranjos ordenados de moléculas numa repetitiva matriz, ou seja, cristais (GENCK *et al.* 2019).

A importância das curvas de solubilidade para a cristalização pode ser exemplificada na Figura 2, onde existem a própria curva de solubilidade e o denominado limite metaestável para um soluto e um solvente quaisquer. Abaixo da curva de solubilidade, existe a região de insaturação onde ainda não foi possível alcançar o grau máximo e estável de dissolução de um componente. Acima da curva de solubilidade, existe a denominada região de supersaturação onde o solvente consegue comportar uma maior quantidade de soluto do que o limite estabelecido pela curva de solubilidade, porém de modo instável através de uma diferença de potenciais químicos sob uma temperatura fixa. A região de supersaturação é subdividida em uma zona metaestável e uma zona lábil através do limite metaestável. Esse perfil da curva de solubilidade se for linear ou se apresentar uma função exponencial decrescente mudará completamente o perfil do limite metaestável. Por conseguinte, também mudará os mecanismos e os métodos para que haja a cristalização (FOUST *et al.* 2013).

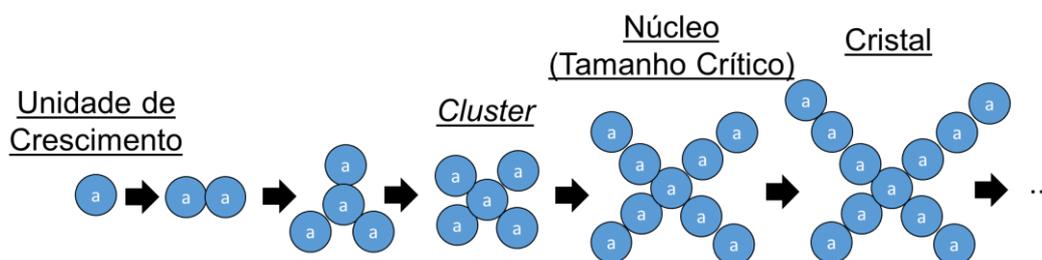
Figura 2 – Representação das regiões de insaturação e de supersaturação com a curva de solubilidade e o limite metaestável para um soluto e um solvente quaisquer



Quando essa mistura binária (soluto e solvente) encontra-se na região lábil, há uma extrema instabilidade do grau de dissolução desse componente e qualquer colisão, como um pequeno material particulado (gérmen de cristalização), é o suficiente para induzir a cristalização através de um mecanismo conhecido como nucleação. Um exemplo prático é quando o vapor de água pode mudar do estado gasoso para o estado sólido através da sublimação inversa ou ressublimação diante do choque com grãos de poeira em pleno ar. Esta mudança de fase origina os hexagonais flocos de neve (FOUST *et al.* 2013).

Na nucleação (Figura 3), à medida que alguns íons dissolvidos no solvente (unidades de crescimento), sob uma região lábil, realizam interações intermoleculares, há a formação de uma entidade instável denominada de *cluster*. Instável porque esse *cluster* pode voltar a se separar novamente a depender das condições energéticas, contudo se o *cluster* continuar crescendo até atingir um tamanho crítico, há a formação de uma entidade com estabilidade que é o núcleo. Ao acréscimo de íons a esse tamanho crítico do núcleo, é dado o nome de cristal. Esse mecanismo de nucleação é primário porque o núcleo é formado através do desenvolvimento de um único *cluster*, mas pode ser secundário com a aglomeração de distintos *clusters*. Além da nucleação, seja primária ou secundária, existe um outro mecanismo de cristalização que é o crescimento de cristais, onde núcleos já formados estão na região metaestável e aumentam de tamanho com a adsorção de íons por ainda haver uma instabilidade energética (diferença de potenciais químicos) (MULLIN, 2001; GUARDANI; SECKLER; GIULIETTI, 2020).

Figura 3 – Teoria de nucleação primária de um cristal



Uma substância pode apresentar uma ou mais formas de arranjos ordenados de moléculas ao cristalizar, logo uma substância pode apresentar um polimorfismo. Esse fenômeno ocorre porque, na natureza, é comum o equilíbrio ser alcançado com o menor consumo energético, considerando o ambiente em que o soluto e o solvente encontram-se. Na prática de um processo industrial, polimorfos podem ser formados sob diferentes condições operacionais como variações de temperatura e pressão, alterando propriedades mecânicas, físico-químicas e térmicas, outrossim, interações biológicas. O nitrato de amônio é utilizado frequentemente como fertilizante, mas pode-se perceber que os dois átomos de nitrogênio nessa molécula apresentam uma variação do número de oxidação entre -3 e +5, sendo o mínimo e o máximo estados oxidativos permitidos para o grupo do nitrogênio na tabela periódica. Em condições de aquecimento, há uma reação autorredox que libera uma abrupta quantidade de energia, caracterizando uma explosão. Logo, o polimorfismo pode transformar uma substância de um fertilizante para um explosivo (OXLEY *et al.* 2002).

A solubilidade, como exemplo de propriedade físico-química, é fortemente influenciada pela morfologia do cristal. Portanto, uma mesma substância pode ter distintas solubilidades, e os polimorfos mais estáveis são os que apresentam as menores solubilidades. Um aspecto importante ainda sobre o polimorfismo é que nos processos de resfriamento ou aquecimento para obtenção dos cristais, moléculas de água podem aderir às moléculas do cristal formando inclusões, mas esses compostos hidratados não são as mesmas moléculas isoladas. Portanto, são denominados de pseudopolimorfos (GUARDANI; SECKLER; GIULIETTI, 2020).

O carbonato de cálcio pode apresentar 3 formas cristalinas distintas e apresenta um perfil de curva de solubilidade reverso (solubilidade diminui com o aumento da temperatura). Sob fixas temperatura e pressão, existem por ordem crescente de solubilidade: a calcita (encontrada nas minas de calcário); a aragonita (encontrada em cavernas cársticas e em exoesqueletos de animais); e a vaterita (encontrada em cálculos biliares e urinários). Então, a forma mais estável e mais

comum de cristalização do carbonato de cálcio é a da calcita por apresentar a menor solubilidade (CHEN, XIANG, 2009).

Os métodos para cristalização de compostos variam conforme os perfis das curvas de solubilidade. A formação de cristais pode apresentar métodos como: I) por resfriamento, quando a solubilidade do soluto é diretamente proporcional à temperatura, evitando-se o uso de trocadores de calor para não causar incrustações; II) por evaporação, como ocorrem nas salinas para produção de NaCl, onde o soluto apresenta uma baixa variação com a mudança de temperatura; III) por *melt*, quando um sólido contém duas ou mais substâncias e precisa haver a separação de uma por distintos pontos de fusão; IV) por precipitação por antissolvente, em que a solubilidade de um soluto reduz com a formação de um solvente misto; V) por precipitação por reação química, onde há a síntese de um produto pouco solúvel; entre outros (GUARDANI; SECKLER; GIULIETTI, 2020).

No caso da precipitação de carbonato de cálcio induzida por micro-organismos, o concreto ou o cimento solidificado apresenta fraturas porosas, as quais podem ser preenchidas por soluções ou sistemas gasosos, contendo o lactato, micro-organismos, esporos microbianos, ar e/ou O₂. Logo, esse sistema que pode ser trifásico contém duas etapas principais: as reações bioquímicas e a cristalização, este último de acordo com cada modelo de cristalizador. A medição das taxas de reação e de cristalização resultam na velocidade limitante do processo, possibilitando o conhecimento sobre as condições necessárias para o controle do processo, principalmente na síntese dos 3 polimorfos do CaCO₃. As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam a vantagem de serem negativamente carregadas na parede celular, possibilitando um mecanismo de atração de cátions de Ca²⁺ ou de moléculas não dissolvidas do lactato de cálcio. Quando esse complexo adere à superfície e ocorre a formação dos núcleos cristalinos, tem-se a cristalização do carbonato de cálcio através da biomineralização (LUCAS *et al.* 2018).

Alguns micro-organismos utilizados no processo de cristalização também apresentam um potencial microbiológico para a síntese de surfactantes naturais (biossurfactantes). Esses surfactantes podem auxiliar na autorregeneração de concretos com o uso de bactérias e fungos, porque permitem que os micro-organismos consigam adentrar nos poros do concreto com maior facilidade devido à baixa tensão superficial e à baixa toxicidade desses surfactantes naturais. De modo a promover o aumento da umectação (capilaridade) do fluido, a permitir que os poros

mais estreitos do concreto sejam possivelmente preenchidos por bactérias e fungos, a não eliminar os micro-organismos pela baixa toxicidade e a cristalizar as microfissuras quando necessário (DALTIM, 2011).

Durval *et al.* (2020) estudaram a toxicidade do biossurfactante produzido por uma cepa de *Bacillus cereus* e confirmaram a baixa toxicidade desse surfactante natural ramnolipídeo. Logo, os micro-organismos podem atuar tanto como agentes biocicatrizantes, quanto como produtores de biossurfactantes para melhorar o processo de cristalização.

2.4 CARACTERIZAÇÕES DO CONCRETO AUTORREGENERADO

Todo processo precisa ter parâmetros de qualidade mensurados e padronizados com as finalidades de repetibilidade do processo, entendimento de possíveis e contínuas melhorias e consequente evolução do procedimento do âmbito artesanal para o âmbito tecnocientífico. Nesse sentido, a biomineralização de carbonato de cálcio no concreto via lactato de cálcio sugere que existam ensaios de caracterização quanto às propriedades macroscópicas do cimento e do concreto e às propriedades microscópicas do produto formado pelo agente biocicatrizante na matriz de concreto.

Análises das propriedades macroscópicas para o cimento que podem ser realizadas são:

- Consistência de Pasta Normal: é uma técnica regida no Brasil pela NBR 16606 que traduz a profundidade de penetração de uma sonda numa pasta de cimento. Utiliza-se o Aparelho de *Vicat* para essa análise (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2018b).
- Tempo de Pega: é uma técnica regida no Brasil pela NBR 16607 que traduz o enrijecimento de uma pasta de cimento. O Aparelho de *Vicat* também é utilizado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2018c).
- Expansibilidade: é uma técnica regida no Brasil pela NBR 11582 que indica a variação de volume existente no cimento. Normalmente, uma elevada expansibilidade não é requerida devido a uma possível ruptura da pasta de cimento rígida. O equipamento utilizado neste ensaio é o Aparelho de *Le Chatelier* (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016a).

A adição dos agregados miúdos e graúdos permite analisar as propriedades macroscópicas para o concreto. São necessários moldes cilíndricos ou prismáticos para a realização dos experimentos em corpos de prova, os quais seguem a NBR 5738:2015, versão corrigida 2016 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016b). Os ensaios de resistência no concreto podem ser (NEVILLE, 2016):

- compressão simples: é uma técnica na redução do volume ante duas forças axialmente opostas;
- tração simples: é uma técnica contrária à compressão, onde existe o aumento do volume ante duas forças axialmente opostas e
- flexão: é uma técnica que uma força é aplicada ortogonalmente ao centro de massa de um corpo de prova.

Além desses ensaios macroscópicos, existem:

- permeabilidade: capacidade do concreto de reter algum fluido, normalmente utilizando água (MENGEL; KRAUSS; LOWKE, 2020) e
- análise Termogravimétrica (TGA): é uma técnica onde um sólido é aquecido sob uma determinada taxa de calor constante até uma determinada temperatura com a finalidade de perceber a perda de massa de um material e a faixa de degradação de um material (PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017).

Os ensaios referentes às propriedades microscópicas também são importantes para a identificação de quais prováveis componentes estão sendo estudados, além de fornecer características petrográficas de um material. Dentre os ensaios estudados para o bioconcreto, têm-se (MORS, JONKERS, 2017, PINDELSKA; SOKAL; KOLODZIEJSKI, 2017):

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): onde, através de perfis topográficos (tridimensionais), pode-se perceber uma cristalinidade do material ou não. A MEV pode não ser um parâmetro quantitativo por completo pelos diferentes tipos de imagens, conquanto é uma ferramenta muito utilizada para visualizar anormalidades na formação microscópica e
- Difração de Raios X (DRX): é uma técnica cristalográfica, onde um feixe conhecido de raios X é aplicado em uma amostra, sob um determinado

ângulo, proporcionando uma difração do feixe de raios X. À medida que existe um padrão de desvio dos raios, existe também uma variação na densidade de elétrons no cristal, permitindo a formação de um perfil cristalográfico e a identificação dos possíveis constituintes.

As respostas da Microscopia Eletrônica de Varredura são dados de acessível interpretação através da comparação entre fotografias. A DRX, todavia, necessita de uma comparação entre os perfis cristalográficos, os quais apresentam-se em bancos de dados, contendo distintos perfis de várias regiões do mundo. Um dos softwares que possibilita a análise de perfis é o *HighScore Plus®* da *PANalytical B.V.©*, permitindo: importar o perfil cristalográfico obtido de um difratômetro; comparar o perfil com um banco de dados integrado, listando as possíveis compatibilidades com o difratograma e os percentuais de compatibilidade, e editar quais são os componentes prováveis para o material que está sendo trabalhado. Portanto, esse software torna-se uma ferramenta essencial na análise de uma DRX (KAUR *et al.* 2017).

2.5 CONCRETOS AUTORREGENERÁVEIS E SISTEMAS AFINS EM PATENTES

O Registro de Propriedade Intelectual para uma empresa significa um patrimônio intangível, sendo uma expressão do gênio humano. Uma investigação dos registros de patente, pois, é interessante por proteger as ideias dos inventores e por evidenciar os aspectos mercadológicos nos diversos tipos de processos (CHAGAS *et al.* 2018).

Quanto às patentes investigadas sobre a autorregeneração de concretos, foram encontrados métodos e invenções na Holanda, nos EUA, na Coreia do Sul, na China e no Japão, sendo, portanto, uma grande parte das patentes encontrada no continente asiático.

Song, Lee, Park (2014) propuseram um sistema em série e com reciclo de soluções contendo agentes cicatrizantes em cilindros de concreto particionados axialmente. O princípio é comparar a permeabilidade do meio sólido ao potencial de selagem do agente cicatrizante, isto é, quanto menos permeável for o meio, maior será a autorregeneração. Nesse sistema, uma solução percola um cilindro e promove a autorregeneração do concreto de acordo com o nível de pressão da solução sobre o cilindro.

Shin *et al.* (2018) idealizaram a selagem não por imersão em soluções, mas por um processo difusional de gases aplicados ortogonalmente a um bloco de

concreto. Esse corpo de prova continha uma fenda pela qual gases podiam penetrar e promover o processo de regeneração do concreto. É importante ressaltar que blocos de concreto podem ser biorregenerados através do mecanismo de selagem com lactato de cálcio através da difusão do gás oxigênio no concreto.

Jonkers (2010) relata que alguns gêneros de bactérias são preferíveis para a autorregeneração do concreto como *Planococcus*, *Bacillus* e *Sporosarcina*, sendo o gênero *Bacillus* o mais enfatizado. Nessa patente, o inventor Jonkers indica razões mássicas entre: 1) o material bacteriano e o agente de cicatrização na faixa de 1:10000-1:1000000, respectivamente, estando o material celular seco e em proporções bem divididas e 2) o agente de cicatrização e o cimento 1:20-1:2000, preferencialmente numa faixa de 1:50-1:500 (incluindo a água).

Wiktor e Jonkers (2013) propuseram um método para condicionar o concreto à ação bacteriana para a autorregeneração através da mistura de dois líquidos: um agente cicatrizante e um agente gelificante. Essa mistura proporciona a autorregeneração do concreto, principalmente em superfícies inclinadas ou no teto, onde a força peso de um líquido mais fluido impede a permanência no local. Como exemplo, poderiam ser utilizados o silicato de sódio (gelificante) e um sal de cálcio (cicatrizante), como o nitrato de cálcio, sendo sugerida a aplicação do agente cicatrizante após 30 min do agente gelificante.

Li, Zhang, Zhao (2016) sugeriram a implementação da composição do concreto contendo sais de lactato de cálcio e grânulos de perlita para proteger micro-organismos basófilos como a bactéria *Bacillus cereus* das condições ambientais desfavoráveis. Segundo os inventores, a bactéria *Bacillus cereus* em estado dormente e em ambiente seco pode resistir por até 50 anos.

Keung *et al.* (2015) criaram uma metodologia para a formação de microcápsulas com capacidade autorregenerativa do concreto. Esse desenvolvimento empregou inicialmente uma emulsificação entre surfactantes – como dioleato de polietilenoglicol, laurato de sorbitano, isoestearato de propilenoglicol, entre outros – agentes cicatrizantes – como sílica coloidal – SiO_2 – e polímeros de encapsulamento – como poliuretano e poliestireno. Essa mistura foi homogeneizada sob baixas velocidades de rotação – de 50 até 600 rpm – para a formação da emulsão e depois misturada sob altas velocidades de rotação – de 1000 até 12000 rpm – na presença de catalisadores – como carboxilatos de bismuto e zinco e óxidos de mercaptídeos. A mudança de velocidade foi necessária para uma inicial emulsificação e consequente

formação de gotículas de sílica maiores. Altas velocidades de rotação no processo de emulsificação reduziam o tamanho das gotículas de sílica coloidal, causando uma separação de fases.

2.6 CONCRETOS AUTORREGENERÁVEIS E SISTEMAS AFINS EM PERIÓDICOS

Reddy, Ramesh, Macrin (2020a) abordam uma coletânea de agentes cicatrizantes químicos, a saber: misturas cristalinas, polímeros e fibras, tendo em vista à autorregeneração de concretos e indicando também a espessura de recuperação cristalina e o tipo de exposição às condições ambientais (seco ou úmido).

Reddy, Ramesh, Kumar (2020b) trazem uma ótima compilação de 4 tipos de bactérias do gênero *Bacillus*, a saber: *megaterium*, *pasteurii*, *sphaericus* e *subtilis*, em diversas fontes bibliográficas e tendo em vista à aplicação no concreto autorregenerado, indicando onde as bactérias são encontradas, quais são as faixas de concentração celular no meio, qual a temperatura comum de utilização das bactérias e qual o material de encapsulamento. Ademais, comparam a resistência do concreto frente a distintas concentrações bacterianas.

Martuscelli *et al.* (2020) avaliaram o potencial microbiológico de 19 espécies de fungos através de Placas de Petri contendo um meio com ureia ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 6 dias. Após o período estudado, identificaram as cepas de *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium angustitherbarum* e duas cepas de *Penicillium brevicompactum* como agentes de atividade ureolítica pela forte alteração de cor.

Rauf *et al.* (2020) submeteram cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cohnii* e *Bacillus sphaericus* esporulados em diferentes meios contendo ureia (entre 0,0 e 2,8%, m/m de cimento) e lactato de cálcio (entre 1,2 e 4,0%, m/m de cimento) e durante 28 dias, avaliando a espessura de selagem do concreto, os difratogramas dos concretos autorregenerados e a resistência à compressão. Os resultados demonstraram que houve: uma espessura máxima de 0,8 mm; difratogramas contendo calcita e aragonita como polimorfos do carbonato de cálcio; e uma resistência máxima de 42 MPa à compressão. Os autores indicam que a bactéria *B. sphaericus* foi a que obteve a melhor eficiência de recuperação do concreto.

Zhang *et al.* (2019) pré-inocularam paralelamente uma cepa de *Bacillus cohnii* e duas colônias de micro-organismos, estas sob condições anóxicas e anaeróbicas, em um meio contendo lactato de cálcio ($8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Essas soluções foram introduzidas em aparelhos de simultânea testagem da permeabilidade do concreto e da

regeneração do concreto por CaCO_3 em experimentos realizados durante 28 dias. Análises de difração de Raios X também foram estudadas. Os pesquisadores avaliaram que houve uma calcificação máxima de 1,22 mm para condições anóxicas de colônias após o período estudado e que à medida que os sais de cálcio eram incorporados na estrutura do concreto, a resistência à permeabilidade de água era aumentada. Sob essas condições, foram encontrados cristais de calcita e aragonita (ambos cristais de CaCO_3) nos difratogramas.

2.7 IMPRESSÃO 3D

A geometria dos materiais é um fator determinante para o pleno desenvolvimento dos processos químicos, exemplificando-se diferentes impelidores para distintas viscosidades ou chicanas para evitar a formação de vórtices em reatores químicos dos tipos batelada e contínuo. Logo, a maioria das operações unitárias, para transcorrer com plena normalidade e máxima eficiência, necessita de peças construídas e dispostas com a maior precisão possível (FOUST *et al.* 2013).

A denominada “Indústria 4.0” visa a uma automação dos processos, evitando ao máximo o fator humano e prezando por uma maior qualidade de produção. Nesse sentido, a impressão de peças tridimensionais com um menor custo de produção, através de equipamentos capazes de refazer a mesma peça por várias vezes, vem como uma notável técnica para a prototipagem em projetos de pesquisa (DIXIT; KADIMISSETTY; RUSLING, 2018; CAI *et al.* 2019).

Os materiais utilizados na impressão 3D vão desde simples polímeros até resinas, alimentos e vidros. Os polímeros são os materiais mais comuns na impressão 3D, sendo aplicados pela tecnologia de Modelagem por Deposição Fundida (*Fused Deposition Modelling*, FDM) e destacando-se: o ABS (Acrilonitrila-Butadieno-Estireno) para uma maior resistência mecânica nas peças, o PLA (Plástico de Poliacido Láctico) e o PETG (Polietileno Tereftalato de Etileno Glicol) para uma maior resistência química e alguns polímeros flexíveis com características elásticas. Esses polímeros vêm comercialmente em forma de filamentos envolvidos em carreteis e usualmente com um diâmetro de 1,75 mm (PORTANGUEN *et al.* 2019).

A impressão 3D por FDM recorre primeiramente à concepção de uma ideia a ser construída através de softwares computacionais, onde a geometria do sólido irá ser criada conforme a necessidade do usuário, a disponibilidade de modelos construídos para fins semelhantes e, de cunho elementar, o embasamento através de

normas regulamentadoras de um equipamento ou de um processo (PORTANGUEN *et al.* 2019).

Além de todo o perfil da peça, faz-se necessária também uma estimativa das propriedades mecânicas da peça através de softwares denominados de fatiadores: capazes de “traduzir” a forma e a qualidade do desenho 3D na linguagem computacional *G-code*, a qual pode ser lida pela maioria das impressoras 3D por FDM. O nicho “qualidade do desenho 3D” tem, entre outros recursos, o significado baseado nas seguintes características: o preenchimento percentual (*infill*); o tipo geométrico de preenchimento (retilíneo, em malhas, hexagonal, entre outros); a altura de camada do filamento, sendo essencial na determinação de detalhamentos na peça; a velocidade de impressão e as temperaturas aplicadas na fusão do material. A escolha de cada um desses fatores irá influenciar no tempo total de impressão, o qual irá variar conforme o modelo de impressora. Portanto, deve haver um equilíbrio entre qualidade e tempo de impressão para que a peça atenda às necessidades requeridas (PORTANGUEN *et al.* 2019).

2.8 ARDUINO

A operacionalização de um processo torna-se prática, quando sistemas de controle ou equipamentos com rotina são implementados no processo, refletindo uma maior agilidade nas operações e evitando, principalmente, erros humanos. No mercado, existe uma variedade de controladores e microcontroladores com uma codificação fechada (restrita), isto é, plataformas responsáveis por um nicho determinado de sensoriamento e atuação. Na pesquisa, porém, a inovação dos processos é um requisito para que o projeto possa ser incorporado nas indústrias, requerendo uma mescla direcionada de sensoriamento e atuação com um baixo custo de aquisição. Nesse sentido, o microcontrolador *Arduino Uno R3* vem como uma alternativa por apresentar uma codificação aberta para a construção de protótipos no campo da engenharia e dispondo de uma gama de cursos físicos e virtuais para auxiliar a operacionalização dos protótipos de plantas industriais (CAI *et al.* 2019).

A programação do *Arduino Uno R3* consiste em basicamente 4 etapas: 1) declaração de variáveis; 2) configuração de uma rotina padrão; 3) configuração de uma rotina cíclica e 4) configuração de possíveis rotinas adicionais.

A declaração de variáveis consiste basicamente em definir quais sensores ou atuadores estão conectados com os pinos das portas do *Arduino*, inicializar bibliotecas

de comandos para um determinado elemento eletrônico e definir se as variáveis são discretas ou contínuas.

A configuração de uma rotina padrão é tipificada com a terminologia “*void setup()*” e tem as características de: habilitar um monitor serial para que haja o envio de comandos para o *Arduino* e definir as variáveis como entradas ou saídas digitais. Essa rotina padrão é ativada com a inicialização do *Arduino* e só é reativada com a reinicialização do sistema.

A configuração de uma rotina cíclica é nomeada por “*void loop()*” e apresenta como característica principal a execução de uma função intermitente específica. Esta etapa consiste em qualquer comando periódico, que será implementado com as devidas funções condicionais, podendo até fazer uma referência a funções extras.

Finalmente, a configuração de possíveis rotinas adicionais permite que um programador aplique um grupo de funções à parte em vista à utilização ocasional.

A plataforma do *Arduino* consegue reunir todas essas etapas no ambiente de desenvolvimento integrado (*integrated development environmental, IDE*) com gráficos para o acompanhamento dos processos.

2.9 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Uma sequência de experimentos pode ser constituída na base da tentativa e erro de forma aleatória ou estratégica. A aleatória, por não ter um padrão bem definido, sugere que a sequência seja realizada para obter-se uma percepção do resultado, mas não permite inferir muitas características correlacionando os dados de entrada com os dados de saída. Essas características tornam-se progressivamente mais difíceis de serem relacionadas de acordo com a quantidade de variáveis inseridas no sistema (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Uma sequência de experimentos, com toda uma lógica estatística atribuída como base estratégica, pode ser considerada como um planejamento fatorial ou um delineamento experimental. Esse planejamento irá agregar: a teoria de um processo, as ferramentas hábeis para que o processo seja executável e o discernimento de quem está aplicando para diferenciar a normalidade dos imprevistos, os quais são os elementos responsáveis por tornar a teoria válida. Isto é, apesar dos imprevistos, um conjunto de dados de entrada sob uma determinada faixa de operação irá resultar em um conjunto de dados de saídas iguais ou diferentes, sendo um fato que normalmente não é observado em um modelo (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Os dados de entrada são denominados de variáveis independentes, e os dados de saída são variáveis dependentes em um planejamento fatorial. O tipo, a quantidade e a distribuição de variáveis independentes influenciam na escolha do planejamento mais adequado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Para um delineamento contendo uma grande quantidade de variáveis independentes, sugere-se um planejamento fracionário ou um planejamento *Plackett-Burman*, cujos ensaios são realizados com a finalidade de perceber quais variáveis são estatisticamente significativas, ou seja, quais elementos investigados na entrada que irão representar uma variação expressiva nos elementos da saída de um processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

No caso de uma pequena quantidade de variáveis independentes, é prudente a utilização de técnicas mais refinadas como planejamentos completos, delineamentos compostos centrais rotacionais, delineamentos compostos de faces centradas e uma gama de recursos estatísticos com a finalidade de extrair dos dados a máxima quantidade de conhecimento possível. Ademais, não existe um planejamento perfeito para um caso geral, conquanto pode haver uma perfeita adequação de um método estatístico a uma determinada situação (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

No caso da autorregeneração do bioconcreto, as informações da composição do cimento e dos agregados miúdos e graúdos, as formas de cicatrização do bioconcreto e o entendimento do fenômeno da cristalização são uma fonte de dados para entender quais são as potenciais variáveis independentes no processo. As técnicas de caracterização compreendem as respostas obtidas do estudo avaliativo das variáveis de entrada. As peças de impressão 3D com o microcontrolador *Arduino* são as ferramentas obtenção dos dados. E os planejamentos fatoriais são os mapas para esquematizar todo o estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na cadeia de inovação, a pesquisa básica e a pesquisa experimental são as primeiras etapas para a elaboração sólida de um projeto. À medida que um projeto vai sendo construído, novas etapas surgem até que a ideia esteja pronta para ser comercializada.

A tese realizada teve como primeira finalidade entender quais foram as necessidades especiais do processo de biomineralização de carbonato de cálcio através de experimentos iniciais, variando diferentes micro-organismos – *B. cereus* (UCP 1615), *B. methylotrophicus* (UCP 1616) e *B. subtilis* (UCP 999) – e depois variando diferentes tipos de cimento de grande uso comercial para a bactéria que mais demonstrou um potencial microbiológico.

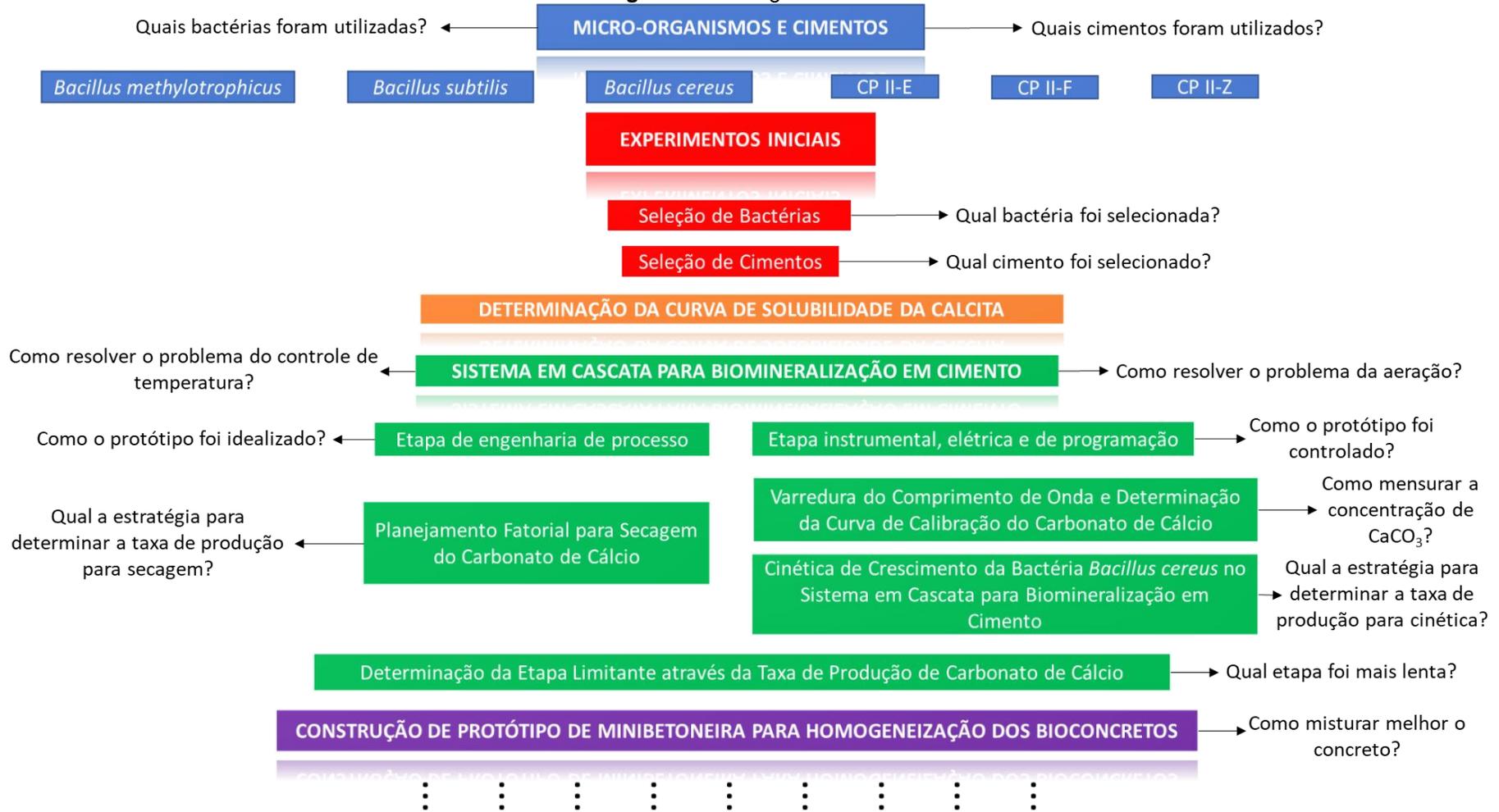
Em sequência, houve a busca das condições de solubilidade através da curva de solubilidade da calcita.

As necessidades especiais da biomineralização do carbonato de cálcio em cimento foram entendidas como aeração e controle com acurácia da temperatura, indicando a construção do Sistema em Cascata para Biomineralização em Cimento. Houve duas etapas para a construção do protótipo: uma etapa de idealização do processo como um todo (engenharia de processo) e uma etapa para controle do processo (instrumental, elétrica e de programação).

Logo após, foram realizadas as etapas de secagem sob um planejamento fatorial do tipo delineamento composto central e rotacional, variando a temperatura, a concentração de carbonato de cálcio e a aeração e de cinética química com a variação do tempo. A etapa de cinética necessitou de uma varredura do espectro de onda e determinação da curva de calibração para carbonato de cálcio. Ambas as etapas tiveram como parâmetro de resposta a taxa de produção de carbonato de cálcio.

Em sequência, foram comparadas as duas taxas de secagem e de cinética para determinação da etapa mais lenta do processo e, portanto, controladora, indicando quais as possíveis soluções para os valores encontrados. Também foi construída uma minibetoneira que deve ser automatizada em breve para melhor homogeneização de misturas de cimento e de concreto. Ademais na Figura 4, é possível verificar um resumo gráfico da presente tese de modo a ser um guia para o leitor.

Figura 4 – Fluxograma da tese



3.1 MICRO-ORGANISMOS E CIMENTOS

A via de biomineralização de CaCO_3 por lactato de cálcio através das bactérias do gênero *Bacillus* é o mecanismo de reação bioquímica mais adequado por caracterizar uma produção sustentável (*ecofriendly*), visando a uma baixa aplicação de cimento diante da potencial toxicidade do material mais utilizado no mundo: o cimento. Logo, as bactérias selecionadas para o estudo foram: *B. cereus* (UCP 1615), *B. methylotrophicus* (UCP 1616) e *B. subtilis* (UCP 999) por serem micro-organismos utilizados em processos biotecnológicos, como na produção de biosurfactantes e que, portanto, apresentam um potencial microbiológico para degradação de componentes orgânicos com decorrente síntese de metabólitos secundários (CHAPRÃO *et al.* 2018; OSTENDORF *et al.* 2019). Os cimentos utilizados em decorrência, principalmente, da disponibilidade foram: CP II-E, CP II-F e CP II-Z.

3.2 EXPERIMENTOS INICIAIS

3.2.1 Seleção de micro-organismos

Os primeiros estudos visaram a elaboração de poucos ensaios que indicassem o potencial microbiológico das bactérias do gênero *Bacillus* para a autorregeneração de biocimento, sendo conceituados esses ensaios como provas de conceito para a elaboração das etapas consecutivas. Conforme estudos preliminares e laboratoriais, foram adicionadas 3 quantidades diferentes de lactato de cálcio (0,58, 1,00 e 1,42 g) a 9 placas de Petri (15 cm), contendo o cimento CP II-Z (20 g) em vista a sequenciais aplicações em planejamentos fatoriais. Logo, para cada massa de lactato, 3 placas foram preparadas, no entanto, os ensaios não foram em triplicata. Essas misturas foram acrescidas de 11 mL de água destilada (pH 7) com a finalidade de manter a relação (água/(cimento + lactato), m/m), variando entre uma faixa de 40 e 60% para manter uma estabilidade. Essas misturas foram homogeneizadas manualmente e submetidas a uma temperatura de 50°C durante 4 h em estufa de secagem, e não microbiológica, do material cimentício.

Após o arrefecimento das placas de Petri à temperatura ambiente com as 3 misturas cimentícias, foram preparados 3 meios de cultura Caldo Nutriente Padrão estéril com as 3 bactérias descritas. Os micro-organismos foram pré-inoculados em meio durante 24 h, sob 28°C e sob uma agitação de 200 rpm (CHAPRÃO *et al.* 2018; OSTENDORF *et al.* 2019). Uma concentração de $1 \cdot 10^7$ células por mililitro foi

adicionada em cada mistura de cimento/lactato hidratados assepticamente com a concentração definida, predizendo um planejamento fatorial com a finalidade de perceber se há ou não a biomineralização do CaCO_3 . Por esta razão o experimento não ocorreu em triplicata, pois para cada placa havia uma concentração de lactato diferente e um micro-organismo específico.

As cristalizações apresentadas foram submetidas a um equipamento de Difratomia de Raios X (DRX) para identificar os constituintes formados. As análises foram realizadas no difratômetro Bruker D2 PHASER, em 30 kV, 10 mA, com uma radiação de Cu- $K\alpha$ sob 1.54 Å. A varredura foi realizada entre 10 e 80° com um passo de 1,0 s e um ângulo de 2θ (LAM; SIN; MOHAMED, 2010). O software HighScore Plus® da PANalytical B.V.© foi utilizado para realizar o refinamento Rietveld no difratograma.

3.2.2 Seleção dos tipos de cimento

Após os ensaios entre diferentes bactérias, o micro-organismo que conseguiu desenvolver cristais nas placas cimentícias foi submetido a testes com variação de 3 tipos de cimento (CP II-E, CP II-F e CP II-Z), aplicando-se o similar método de crescimento do tópico “Seleção de Micro-organismos”, exceto pelo aumento das condições de massa de lactato na mistura cimentícia (1,74, 3,00 e 4,26) também visando a aplicação de um planejamento fatorial.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA CALCITA

Como o produto esperado da biomineralização do lactato de cálcio pelas bactérias é o CaCO_3 , um composto com baixa solubilidade em água e com a curva de solubilidade reversa, foi necessário se investigar na literatura as bases de dados para a determinação da curva de concentração do CaCO_3 , que está condicionada à temperatura operacional.

Segundo Visscher e Vanderdeelen (2011), as solubilidades entre calcita, aragonita e vaterita, os 3 polimorfos do CaCO_3 , são diferentes. A forma mais estável do CaCO_3 é a calcita. A partir de 60 pares de dados obtidos (ANEXO I) dos referidos autores foi adaptado um gráfico para comparação das solubilidades da calcita com a faixa de variação de temperatura entre 5 e 35°C, considerando a massa molar do CaCO_3 como 100 mg·mmol⁻¹.

A partir dos dados extraídos da literatura citada, foi criada uma curva de solubilidade para poder prever qual é o limite máximo de saturação em cada temperatura de modo a trabalhar em condições desde a não cristalização da água (congelamento) até um limite de temperatura de 35°C de trabalho entre bactérias do gênero *Bacillus* (REDDY; RAMESH; KUMAR, 2020b).

3.4 SISTEMA EM CASCATA PARA BIOMINERALIZAÇÃO EM CIMENTO (SCBC)

A partir dos dados obtidos nos experimentos iniciais, pode-se perceber que sob condições específicas existem de modo concomitante a reação bioquímica, que transforma o lactato em carbonato, e a cristalização, que impregna o carbonato no cimento. Essas condições requerem um estudo separado das duas etapas para a determinação da etapa limitante, principalmente porque são tratados fenômenos bioquímicos e físico-químicos. Portanto, um sistema em série foi desenvolvido para avaliação das condições operacionais de reação bioquímica e cristalização de carbonato de cálcio.

O Sistema em Cascata para Biomineralização em Cimento (SCBC) foi baseado na via de autorregeneração por lactato de cálcio (Equação 6 e Equação 7), decorrente principalmente da necessidade de regeneração do concreto sem induzir uma possível corrosão em casos de concreto armado. Diferentemente dos experimentos iniciais, no SCBC foi possível introduzir uma aeração controlada para a alimentação com gás oxigênio nas denominadas células reacionais. Assim, os micro-organismos podem realizar a fermentação alcoólica para síntese do CaCO_3 .

Esse sistema pode ser dividido em 2 etapas: I) Etapa de Engenharia do Processo e II) Etapa Elétrica e de Programação.

3.4.1 Etapa de engenharia de processo

Na Figura 5, está o fluxograma de engenharia do Sistema, onde existem:

- um compressor RSElectrical RS-A98 com 4 saídas de aquário para injeção do ar no ambiente com vazão total de $12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;
- um rotâmetro de ar LZT M-6 com medição da vazão entre $0,5$ e $5,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (dado pela sigla FIC – *Flow Indicator and Controller*);
- dois filtros hidrofílicos Millipore Millex-GV com poros de $0,22 \mu\text{m}$;
- uma estufa bacteriológica Tecnal TE-392/93L com faixas de medição de temperatura entre $35,0$ e $60,0^\circ\text{C}$ e erros de $0,1^\circ\text{C}$;

- cinco células reacionais (Figura 6) confeccionadas em material PETG por impressora Furling Yan, altura de camada de filamento de 0,2 mm, um volume unitário (cada biorreator) de 250 mL e recobertas por resina IBEX poliéster cristal 67 e
- 5 anéis de vedação de borracha para os reatores.

Figura 5 – Fluxograma de engenharia de processos do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento

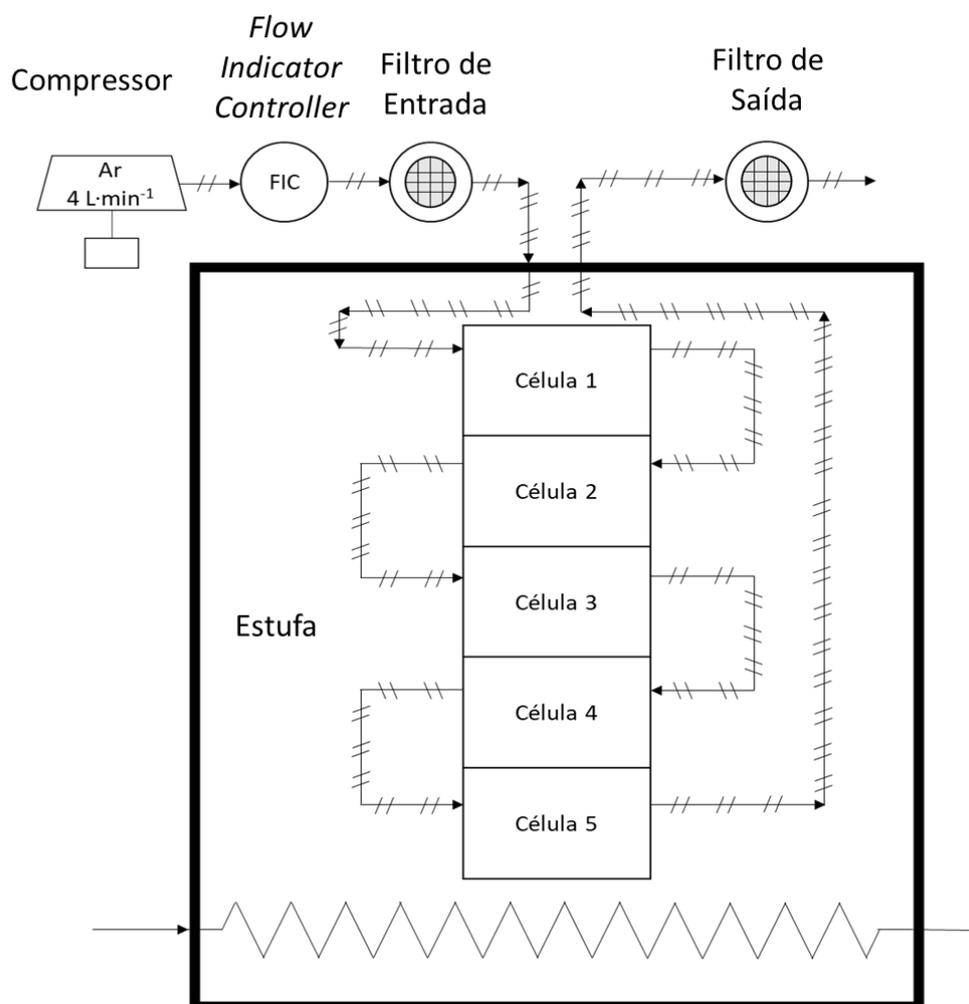
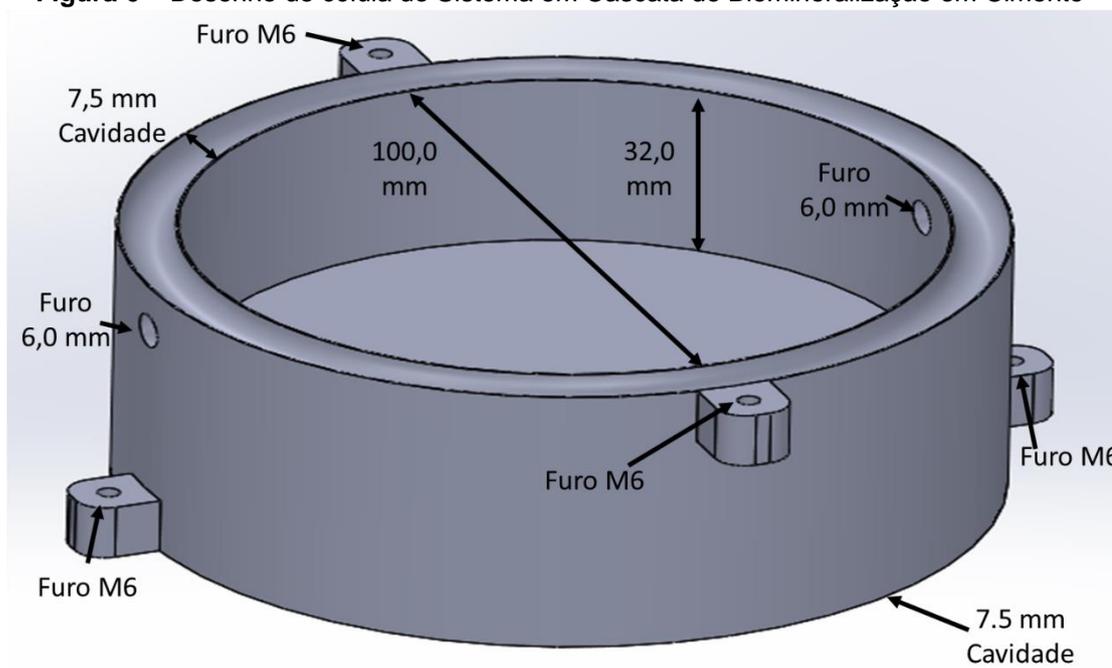


Figura 6 – Desenho de célula do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento



O SCBC, se comparado a uma unidade de reator do tipo batelada em fase fluida, apresenta aeração e temperatura controladas e filtragem de micro-organismos na entrada e na saída do volume reacional. Os filtros foram utilizados na entrada para impedir que micro-organismos indígenas adentrem no meio reacional através do compressor, evitando que o lactato de cálcio seja degradado por outras espécies, e na saída para impedir que os micro-organismos inoculados no meio contaminem o meio externo.

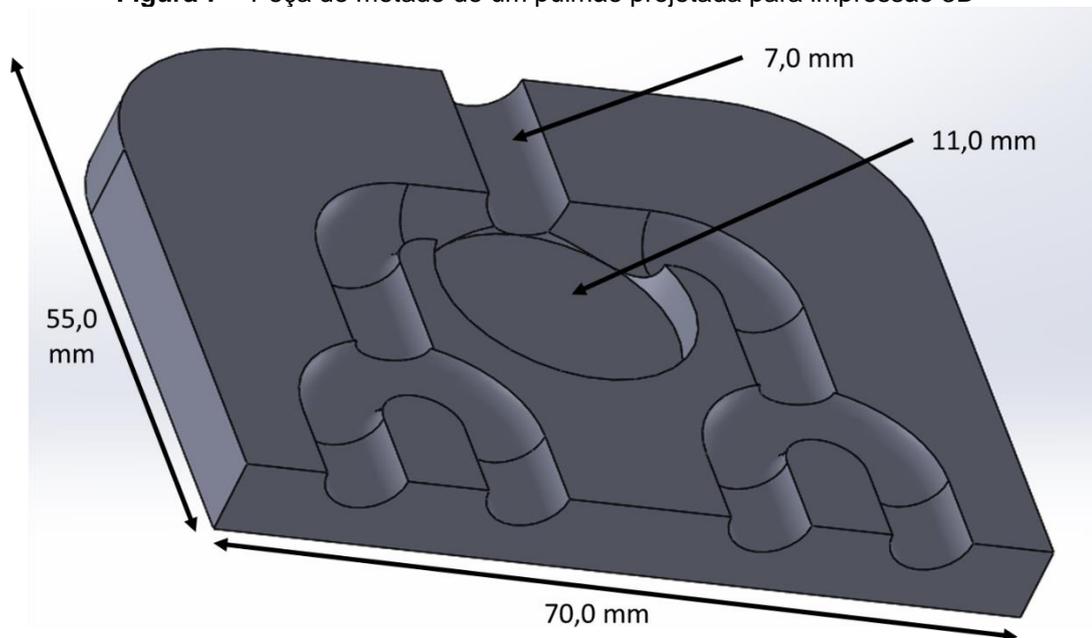
As células reacionais foram baseadas em placas de Petri, mas adaptadas com furos laterais para entrada e saída de ar e com um material mais resistente a quebras do que o vidro (PETG). Em cada célula, foi incluída uma cavidade para colocar borrachas de vedação de tubos de 100 mm, além de 4 conectores laterais para poder unir uma única célula reacional a outras duas células: uma em cima e outra embaixo, permitindo uma operação em série. O sistema poderia também ser feito em paralelo, no entanto precisaria de um maior controle da vazão em cada célula reacional. Portanto, a opção em cascata (em série) foi a melhor escolha para o processo.

As 5 células reacionais de vidro também foram construídas com diâmetro interno de 78 mm, altura de 86 mm e 2 furos a 50 mm do fundo de 10 mm para fins alternativos, em caso de imprevistos com as células reacionais de PETG.

As 4 saídas do compressor precisaram ser unidas em uma só através de um pulmão também projetado pela impressão em 3D. Esse pulmão foi impresso em duas

metades de modo que o pós-processamento com a impermeabilização por resina estivesse em toda a superfície interna, impedindo vazamentos na peça. Depois as duas metades foram coladas, e duas novas camadas de resina foram aplicadas para recobrir o exterior da peça (Figura 7).

Figura 7 – Peça de metade de um pulmão projetada para impressão 3D



A necessidade de invenção do SCBC teve como maiores objetivos: I) determinar qual é a etapa limitante (portanto mais duradoura) no processo e II) condicionar o melhor ambiente possível para a formação dos cristais de carbonato de cálcio no cimento ou no concreto.

O primeiro objetivo pode ser traduzido na comparação entre as taxas de produção de carbonato de cálcio das etapas de reação bioquímica e de cristalização. A taxa que for a mais lenta, seja para conversão dos íons em cristais ou seja para a conversão de lactato em carbonato, será a controladora do processo. Por isso que o SCBC apresentou também o segundo objetivo com precisos controles de vazão de ar e de temperatura. A convecção forçada do ar dentro das células reacionais, além de retirar as moléculas de água presentes no meio por evaporação, também reage em cerca de 21% (fração volumétrica do oxigênio no ar atmosférico) com o lactato, segundo a Equação 6, produzindo água, a qual também é evaporada pela contínua convecção.

Portanto, saber as umidades dentro e fora (condições ambientes) do processo torna-se uma derivação desses dois objetivos, abrindo espaço para a inclusão de um supervisor no SCBC.

3.4.2 Etapa instrumental, elétrica e de programação

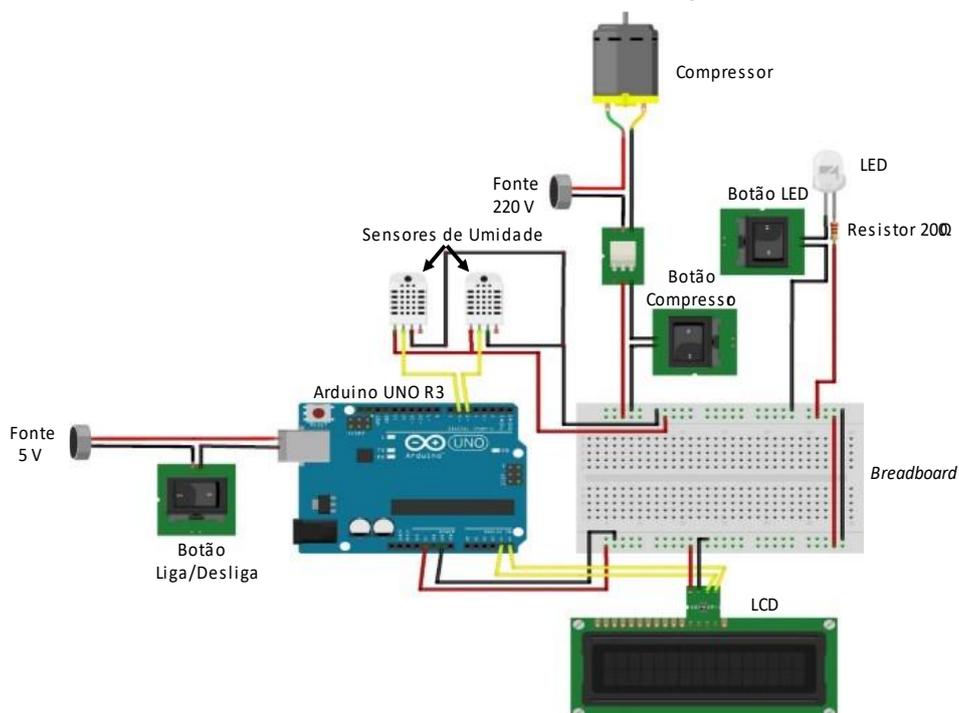
Após a etapa de engenharia de processo, foi utilizado o hardware *Arduino UNO R3* para não apenas medir as umidades dentro e fora do sistema, bem como para ativações de um compressor para fornecer a aeração nas células reacionais e de um LED para iluminar o interior da estufa.

No tocante às umidades, é interessante saber a diferença entre as umidades do sistema e do ambiente porque todos os experimentos não foram realizados em uma única hora, ou até em um único dia, além de que, a depender das condições climáticas do local experimental, a umidade do ambiente pode mudar rapidamente. O software do *Arduino* permite realizar cálculos aritméticos simples de modo que o operador do supervisor visualize diretamente a informação desejada. Nesse caso, a diferença entre umidades. Assim, testes foram realizados ao longo de 1 h, comparando as diferenças entre umidades dos sensores.

A visualização dos dados através do software do *Arduino* pode ocorrer no próprio computador com a captação de dados pontuais ou em gráficos, de telas (*displays*) de 1, 2 ou mais dígitos com 7 segmentos, ou de telas de cristal líquido (*Liquid Crystal Display – LCD*).

Neste sentido, foi montado um circuito (Figura 8) através do software *Fritzing* para representar na prática como foi configurado o supervisor com o microcontrolador *Arduino UNO R3* para medições das diferenças entre umidades, outrossim para ativação do compressor e do LED.

Figura 8 – Esquemática do circuito elétrico para medição das umidades no ambiente e no Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento



Nesse circuito, os instrumentos utilizados foram:

- um microcontrolador Arduino UNO R3;
- um filtro de linha de 220 V;
- uma fonte de 5 V;
- três botões liga/desliga;
- uma *breadboard*;
- uma tela LCD azul 16x2 dígitos com um módulo I2C;
- um módulo relê para acionamento de até 5 V;
- dois módulos de sensor de umidade DHT22;
- um LED branco;
- um compressor RSElectrical RS-A98 e
- fios.

Além dos componentes elétricos e eletrônicos, uma caixa de disjuntor e espirais organizadores de fios foram utilizados para comportar o circuito de modo a oferecer uma proteção e uma estabilidade às peças e aos instrumentos. O supervisor foi conectado a uma alimentação de 220 V com corrente de 10 A. A fonte de 5 V converteu os 220 V para os 5 V de alimentação do *Arduino*, e a ligação de 220 V foi

conectada diretamente ao módulo relê aberto para só fosse ativado com o comando do microcontrolador.

Testes em triplicata foram realizados com a finalidade de secar 100 mL de água destilada em apenas 1 célula reacional no SCBC, sob uma aeração de $3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ nas células reacionais de PETG, sob 35°C . A potência total do protótipo também foi calculada, a partir da soma de 1 estufa, 1 LED, 2 sensores de umidade e 1 microcontrolador Arduino UNO R3.

3.4.3 Planejamento Fatorial para Secagem do Carbonato de Cálcio

A biomineralização do bioconcreto pela via de lactato consiste na conversão do lactato em carbonato e na cristalização do material inorgânico no concreto. As duas etapas envolvidas (biorreação e cristalização) precisam ser estudados para determinação da etapa limitante do processo, ou seja, aquela etapa que ocorre mais lentamente.

No caso da cristalização por aquecimento, foi realizado um planejamento fatorial, envolvendo 2 variáveis de entrada controladas pelo SCBC: vazão de ar ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) e a temperatura de secagem ($^\circ\text{C}$), além de 1 variável de entrada ajustada no início de cada experimento, que foi a concentração de carbonato de cálcio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). O tipo de planejamento fatorial escolhido para o estudo foi o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), diante da grande vantagem dos 5 níveis de estudo e da baixa quantidade de variáveis.

Os pontos centrais de cada variável foram: para a vazão de ar ($2,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), pois era a metade da faixa operacional do rotâmetro em funcionamento, apesar da escala do rotâmetro chegar a $5,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, o compressor apenas consegue alcançar o pico de $4,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; a temperatura de $37,0^\circ\text{C}$, pois é um ponto intermediário entre uma temperatura inicial de controle da estufa (a partir de 35°C) e uma temperatura que pode descontaminar o material celular e uma concentração de carbonato de cálcio de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para ser um valor abaixo da saturação na curva de solubilidade do polimorfo calcita.

Na Tabela 1, foi possível perceber que a presença de 3 variáveis de entrada no planejamento torna os níveis cúbicos $\pm 1,68$. A partir das definições dos níveis, as variáveis foram calculadas de forma a não ultrapassar os limites operacionais: do compressor, da curva de solubilidade e da estufa. Na Tabela 2, sucede-se a Matriz dos Experimentos.

Tabela 1 – Matriz de níveis para secagem de carbonato de cálcio

Níveis	Vazão de ar (L·min ⁻¹)	Concentração (mg·L ⁻¹)	Temperatura (°C)
-1,68	1,2	332	35,3
-1,00	1,5	400	36,0
0,00	2,0	500	37,0
1,00	2,5	600	38,0
1,68	2,8	668	38,7

Tabela 2 – Matriz de experimentos para secagem de carbonato de cálcio

Níveis	Vazão de ar (L·min ⁻¹)	Concentração (mg·L ⁻¹)	Temperatura (°C)
1	1,5	400	36,0
2	1,5	400	38,0
3	1,5	600	36,0
4	1,5	600	38,0
5	2,5	400	36,0
6	2,5	400	38,0
7	2,5	600	36,0
8	2,5	600	38,0
9	1,2	500	37,0
10	2,8	500	37,0
11	2,0	332	37,0
12	2,0	668	37,0
13	2,0	500	35,3
14	2,0	500	38,7
15	2,0	500	37,0
16	2,0	500	37,0
17	2,0	500	37,0
18	2,0	500	37,0

A partir da Matriz de Experimentos, buscou-se entender como as variáveis de entrada influenciaram a taxa de produção do carbonato de cálcio ($TP_{\text{Carbonato}}$, em $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$). Essa taxa de produção, segundo a Equação 11, é a concentração mássica de carbonato de cálcio ($C_{\text{Carbonato}}$, em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) vezes o volume da solução (V , em L) de 10 mL (0,01 L) em todos os ensaios para obtenção da massa de carbonato dividido pelo tempo necessário para a cristalização do material (t , em h). No processo de

cristalização, foi considerado que 100% do carbonato de cálcio foi cristalizado, pois a solução só conteve carbonato e água destilada.

$$TP_{Carbonato} = C_{Carbonato} \cdot V \cdot t^{-1} \quad (11)$$

Cada ensaio de secagem foi feito separadamente para que fosse respeitada a aleatoriedade do planejamento fatorial, sendo, por consequência, a razão pelo uso fixo dos 10 mL para que fosse requerido o menor tempo possível em cada um dos experimentos. A grandeza encontrada ao fim de cada experimento foi o tempo necessário para a cristalização, que aplicado na Equação 11, resulta na $TP_{Carbonato}$.

3.4.4 Varredura do Comprimento de Onda e Determinação da Curva de Calibração do Carbonato de Cálcio

A determinação do melhor comprimento de onda para uma solução de 5000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbonato de cálcio (calcita) foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro UV-Visível SP-22, com variação do comprimento de onda entre 320 e 1010 μm , a passos de 10 em 10 μm . A similar varredura de comprimento de onda foi realizada para uma solução de 5000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactato de cálcio. Como os dois sais, orgânico (reagente) e inorgânico (bioproduto) dispõem do cátion Ca^{2+} na composição, foram investigadas as duas soluções para que não houvesse a possibilidade de, ao analisar uma amostra contendo apenas carbonato, fosse identificada alguma concentração de lactato.

A partir da determinação do melhor comprimento de onda para o carbonato, a solução de 5000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foi diluída em 28 soluções entre 1 e 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para determinação da curva de calibração do carbonato. A Tabela 3 apresenta as concentrações das 28 soluções preparadas mais a solução de 5000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabela 3 – Preparo de soluções para determinação da curva de calibração de carbonato de cálcio

Ensaio	Concentração Desejada (mg·L ⁻¹)	Concentração Inicial (mg·L ⁻¹)	Volume de Transferência (μL)	Volume do Balão de Diluição (mL)	Volume de Água Destilada (mL)
0	5000	5000	Pesar 0,500 g de calcita	100	100,000
1	1000	5000	10000	50	40,000
2	900	5000	9000	50	41,000
3	800	5000	8000	50	42,000
4	700	5000	7000	50	43,000
5	600	5000	6000	50	44,000
6	500	5000	5000	50	45,000
7	400	5000	4000	50	46,000
8	300	5000	3000	50	47,000
9	200	5000	2000	50	48,000
10	100	5000	1000	50	49,000
11	90	5000	900	50	49,100
12	80	5000	800	50	49,200
13	70	5000	700	50	49,300
14	60	5000	600	50	49,400
15	50	5000	500	50	49,500
16	40	5000	400	50	49,600
17	30	5000	300	50	49,700
18	20	5000	200	50	49,800
19	10	5000	100	50	49,900
20	9	5000	90	50	49,910
21	8	5000	80	50	49,920
22	7	5000	70	50	49,930
23	6	5000	60	50	49,940
24	5	5000	50	50	49,950
25	4	5000	40	50	49,960
26	3	5000	30	50	49,970
27	2	5000	20	50	49,980
28	1	5000	10	50	49,990

3.4.5 Cinética de crescimento da bactéria *Bacillus cereus* no SCBC

Após os testes através de um planejamento fatorial para secagem do carbonato de cálcio, os resultados de temperatura e aeração foram selecionados para ser estudada a cinética de crescimento da bactéria *B. cereus*. Esse micro-organismo foi selecionado diante do crescimento cristalino obtido nos experimentos iniciais. A temperatura também foi limitada à operação da estufa adquirida pelo SCBC, onde a temperatura mínima para controle de variações de $0,1^{\circ}\text{C}$ era de $35,0^{\circ}\text{C}$. A aeração de $1,5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e a temperatura de $35,3^{\circ}\text{C}$ foram selecionadas para que a bactéria tivesse a mínima nutrição e aclimatação requeridas.

Neste experimento foram utilizadas as 5 células reacionais de vidro interligadas em série com uma solução de 150 mL de lactato de cálcio. Esse volume foi definido diante da taxa de evaporação obtida no planejamento fatorial de secagem e ao se comparar essa taxa ao tempo de 120 h de uma curva comum de crescimento microbiano. Logo, se ao invés da solução de lactato fosse utilizada água destilada, a taxa de evaporação seria de $1,01\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ e após 120 h de secagem, sobrariam apenas 30 mL para mensurar o avanço da cinética microbiana e, conseqüentemente, o volume de 150 mL foi o volume ideal para o experimento. Ademais, um volume igual a 200 mL ultrapassaria os bocais de entrada e de saída das 5 células reacionais, podendo o líquido da solução ser transportado pelas mangueiras entre as células reacionais.

A concentração de lactato foi definida a partir da estequiometria da biorreação química e da curva de calibração de carbonato de cálcio. A faixa de medição do carbonato de cálcio no espectrofotômetro variou entre 100 e $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir da maior concentração de lactato de cálcio mensurável na curva ($1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e do volume de 150 mL, obteve-se a massa teórica de 150 mg de carbonato. Essa seria a massa máxima que em um volume de 150 mL a equação da curva poderia calcular. Valores acima precisariam ser diluídos. Logo, considerando a Equação 6 (conversão do lactato em carbonato) como uma reação elementar para estimativa da concentração de lactato para a cinética, o seguinte cálculo foi realizado.

Na Equação 6, 1 mmol de lactato é equivalente a 1 mmol de carbonato. As massas molares do lactato de cálcio e do carbonato de cálcio são, respectivamente: 218 e 100 mg/mmol. O valor de 150 mg de carbonato de cálcio é equivalente a 327 mg de lactato de cálcio, considerando a estequiometria.

Como no SCBC, não existe agitação das células reacionais intencionalmente, prospectavam-se duas situações. A primeira situação ocorre nos intervalos da cinética de crescimento porque os tempos iniciais para mensurar os parâmetros de saída não são tão curtos com intervalos de 6 em 6 h. Assim como ocorre em cinéticas em *Erlenmeyers* acondicionados em máquinas incubadoras *Shakers*, ou em biorreatores acondicionados em camisas de reator e com o controle da temperatura feito por banhos termostatizados ou por *chillers*. Tanto em *Erlenmeyers*, quanto em biorreatores existe a agitação, a qual permite que o meio de produção se aproxime de uma mistura perfeita e haja a maior probabilidade de colisão entre micro-organismos e reagentes para a síntese de bioprodutos. A segunda situação ocorre no momento em que o sistema praticamente estático (exceto pela presença da aeração) pode não atingir um grau de mistura adequado para uma elevada conversão do lactato em carbonato. Em especial pela segunda situação, a massa de lactato calculada em 327 mg foi acrescida até 500 mg nos 150 mL de cada célula reacional, de modo que houvesse a compensação da falta de agitação para tentar atingir a maior concentração da curva de calibração.

A intenção de não promover a agitação nas células reacionais é justamente pelo motivo do concreto necessitar estar estático para não ocorrer fissuras ou rachaduras, causando uma degradação no concreto. Logo, os ensaios de cinética de crescimento microbiano também precisaram ocorrer em situações estáticas similares.

A bactéria *B. cereus* foi pré-inoculada em Caldo Nutritivo estéril para ativação celular, sob condições de 200 rpm, 30°C e durante 24 h, como nos experimentos iniciais. O volume necessário para atingir a concentração de 10^7 células/mL foi inoculado em cada uma das células reacionais com a solução estéril de lactato de cálcio após as 24 h de pré-inóculo. Conexões como mangueiras e filtros também foram esterilizados para evitar contaminações na cinética.

As 5 células reacionais apresentavam os tempos de 24, 48, 72, 90 e 120 h de cinética. Sempre em intervalos de 24 h pela razão do sistema praticamente estático. Em cada um dos tempos de medição, o pH, a massa de carbonato de cálcio produzida (mg) e a biomassa (mg) foram mensurados. O líquido resultante de cada tempo foi centrifugado a 4000 g durante 15 min para retirada do sobrenadante e pesagem da biomassa. Também foi realizado 1 ensaio em 0 h, contendo apenas a solução de lactato de cálcio.

O resultado da fase estacionária foi o utilizado para também calcular a taxa de produção de carbonato de cálcio ($TP_{\text{Carbonato}}$, em $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$), segundo a Equação 11 anteriormente descrita. As diferenças para a taxa de produção no processo de cristalização foram: a concentração da solução e o volume da solução eram mensurados ao fim de cada tempo, sendo a concentração mensurada pela análise espectrofotométrica.

3.4.6 Determinação da etapa limitante através da taxa de produção de carbonato de cálcio

Nessa etapa, foi preciso determinar qual etapa limitante (mais duradouro) de modo que seja investigado qual a menor taxa de produção de carbonato de cálcio ($TP_{\text{Carbonato}}$), através da razão entre a massa de carbonato de cálcio ($m_{\text{carbonato}}$) pela variação do tempo (Δt), segundo a Equação 11. Futuramente, a fins de aplicação, as etapas poderão ocorrer conjuntamente, haja vista que a finalidade da reação bioquímica é potencializar o preenchimento de frestas, garantindo ao concreto uma menor porosidade e uma maior resistência.

A partir das massas obtidas no planejamento fatorial de secagem e no início da fase de estabilidade na curva de crescimento microbiano divididas pelos respectivos tempos de secagem e biorreação, encontraram-se as taxas de produção de carbonato. Com essas taxas comparadas, derivam 2 situações, lembrando que a $TP_{\text{Carbonato}}$ é inversamente proporcional ao tempo:

- a) se a taxa de secagem for **maior ou igual** do que a taxa da biorreação, a solução é remodelar o SCBC para injetar e mensurar uma menor quantidade de ar, refazendo os experimentos fatoriais e cinéticos para tentar aumentar o tempo de secagem, reduzir a taxa de secagem e não interferir consideravelmente no rendimento da biorreação e
- b) se a taxa de secagem for **menor** do que a taxa de biorreação, existe uma idealidade porque logo após a conversão de lactato em carbonato, existe a cristalização, cabendo ainda uma otimização no processo. Essa otimização provém da redução do tempo de secagem, aumentando a taxa de secagem sem se igualar à taxa de biorreação e aumentar o rendimento da biorreação.

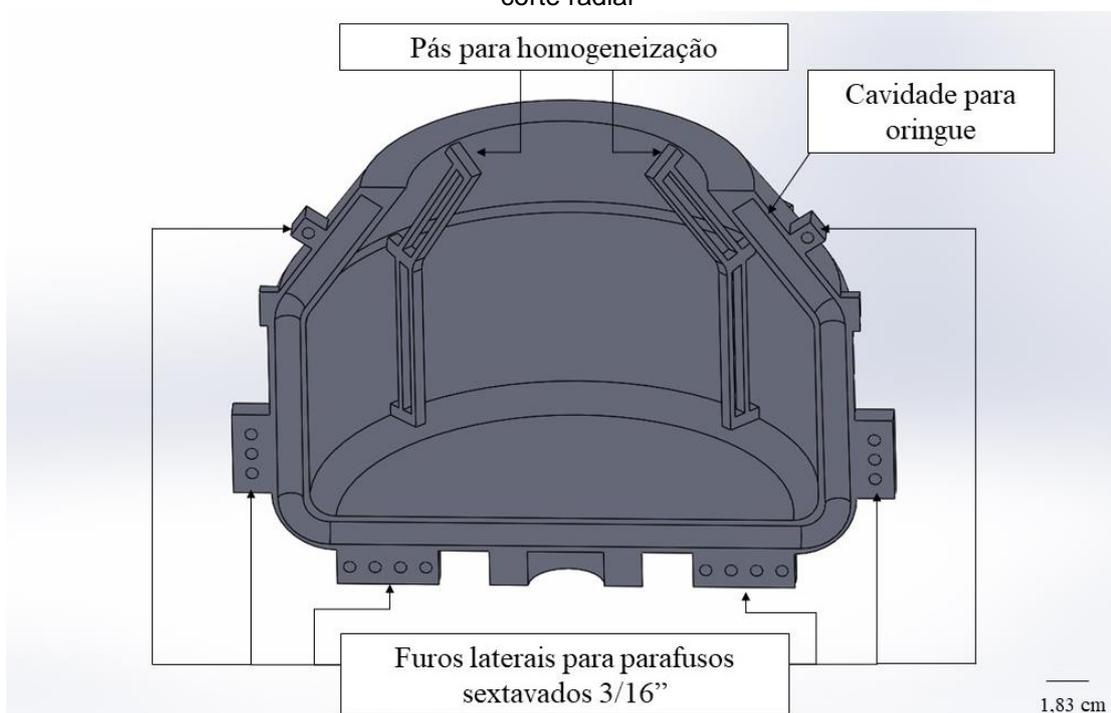
A taxa de produção de carbonato para a secagem não deve ser igual à taxa para a biorreação para que a prioridade seja a conversão do lactato em carbonato para garantir a cristalização do sal inorgânico e não orgânico.

3.5 CONSTRUÇÃO DE MINIBETONEIRA PARA HOMOGENEIZAÇÃO DOS BIOCONCRETOS

O aparecimento de imprevistos precisa ter a mínima quantidade possível de erros humanos. Logo, a construção de uma minibetoneira é a estratégia ideal para a homogeneização do bioconcreto de forma a evitar pontos com baixa concentração de lactato.

A minibetoneira foi construída para ter um volume total de 2,5 L, conforme pode ser verificado na Figura 9, sendo um volume 33,3% maior do volume útil para construção de corpos de prova cilíndricos com uma altura de 20 cm e um diâmetro de 10 cm (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016b). A betoneira foi construída em PETG por ser um material com uma melhor trabalhabilidade e com maior resistência química. Por essa razão, foi aplicada uma impermeabilização com resina cristal para fechamento de possíveis poros da impressão 3D para garantir a total impermeabilização.

Figura 9 – Projeto de minibetoneira em PETG para homogeneização de bioconcretos com corte radial



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

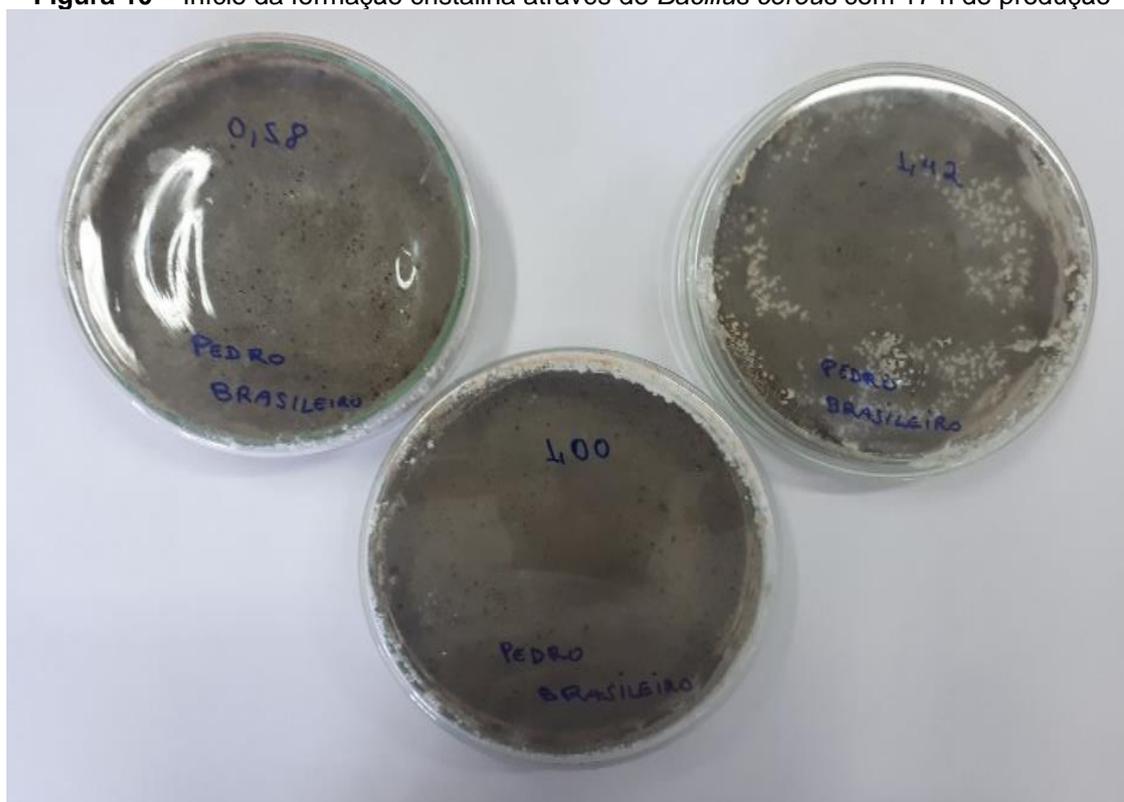
A ciência surpreende pela diversidade de fatores que influenciam um fenômeno. Mecanismos de controle são essenciais para limitar esses fatores e para poder estudá-los com grande possibilidade de imprevistos. Nesse sentido, os experimentos foram conduzidos de modo a trazer os resultados mais reais e lógicos o possível.

4.1 EXPERIMENTOS INICIAIS

4.1.1 Seleção de micro-organismos

Nos ensaios conduzidos em placas de Petri (15 cm), apenas as bactérias *Bacillus cereus* produziram cristais nas placas de Petri a partir de 17 h de armazenamento em estufa conforme pode ser observado na Figura 10 na placa com massa de lactato de 1,42 g.

Figura 10 – Início da formação cristalina através de *Bacillus cereus* com 17 h de produção



Após 168 h de produção, os cristais cresceram de modo a formar estruturas similares a ouriços-do-mar (pontiagudas) sobre a superfície do cimento. Quanto maior a concentração de lactato, entre as quantidades em massa adicionadas, maior a formação das estruturas cristalinas. A placa com a massa adicionada de 1,42 g de

lactato de cálcio pode ser visualizada na Figura 11, e um dos cristais formados foi colocado em microscópio ótico (lente de 20 mm), conforme observado na Figura 12.

Figura 11 – Formação pseudocristalina através de *Bacillus cereus* com 168 h de produção: (A) placa de petri inteira e (B) seção da placa de petri

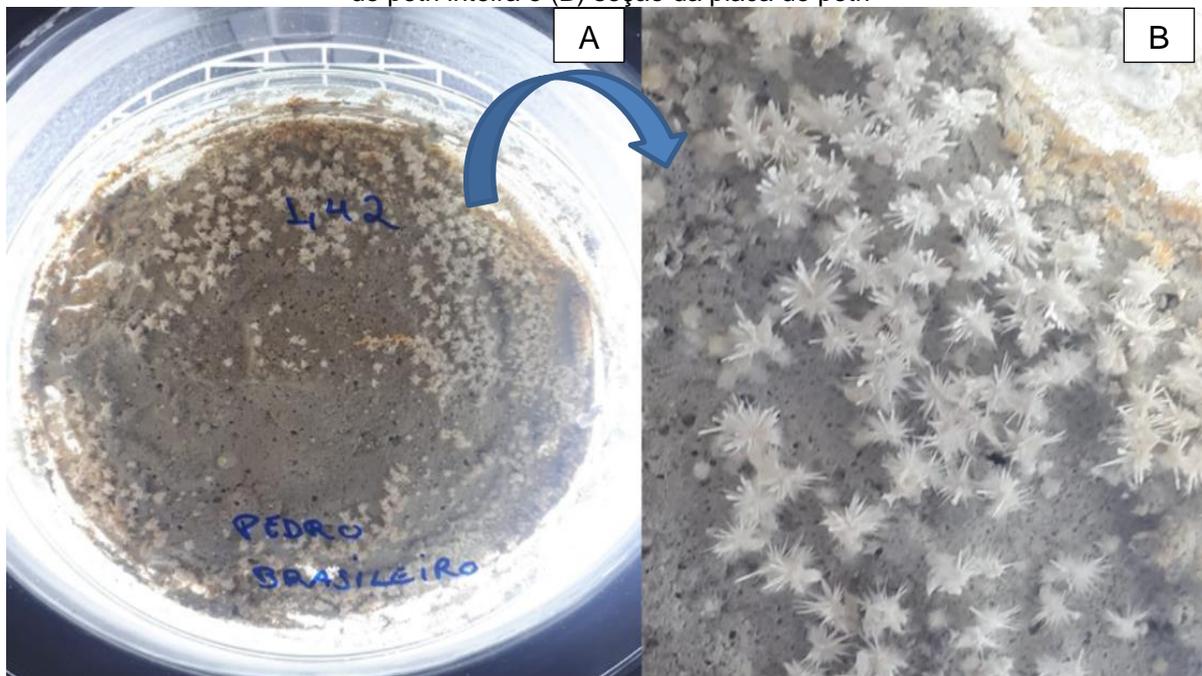


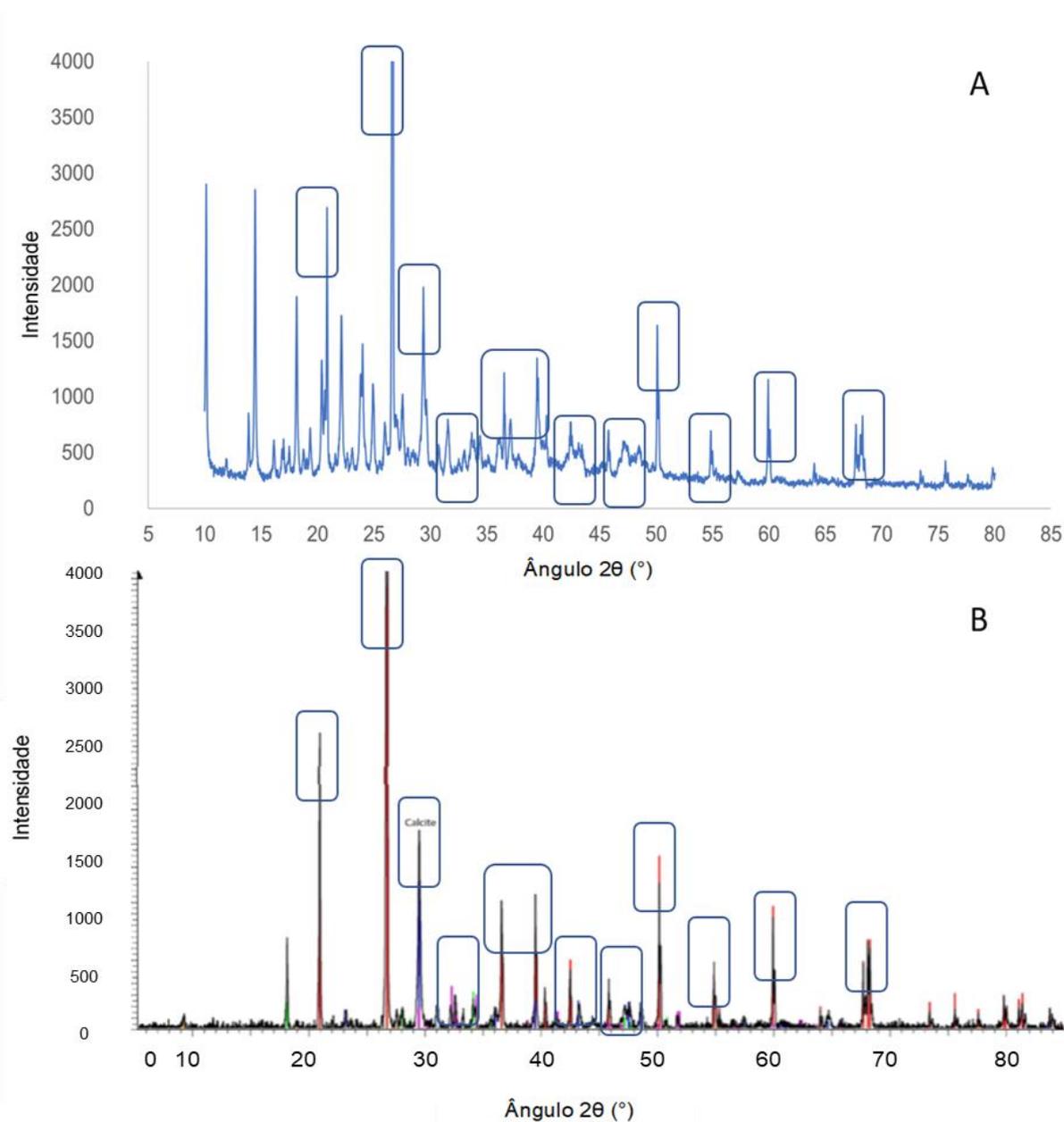
Figura 12 – Cristal produzido por *Bacillus cereus* após 168 h visto em microscópio ótico (20 mm)



O padrão do difratograma encontrado na placa de cimento com 1,42 g de lactato é apresentado na Figura 13A. Os picos encontrados são similares aos padrões encontrados por Lucas *et al.* (2018) em um bioconcreto (Figura 13B) produzido por uma espécie de *Bacillus*, ressaltando que neste trabalho um dos autores é o professor

Henry Jonkers, renomado pesquisador na área de bioconcretos e inventor de patentes de bioconcreto.

Figura 13 – Padrões de difratogramas de raios x de: (A) cristais produzidos por *Bacillus cereus* em placas de cimento após 168 h e (B) fragmentos de bioconcreto encontrado por Lucas *et al.* (2018)



Adaptado de Lucas *et al.* (2018)

Cerca de 82% dos picos do difratograma representaram cristais de SiO_2 , enquanto que 18% dos picos restantes representaram o polimorfo calcita (CaCO_3). Esses dados refletiram que a cristalização das moléculas de SiO_2 presentes no cimento, ou seja, provavelmente não biomineralizadas pela bactéria *Bacillus cereus*, foi uma etapa superior à cristalização da calcita. Quanto à reação bioquímica de conversão de lactato para carbonato pouco pode-se afirmar porque a calcita

encontrada pode ser proveniente de duas fontes: I) do cimento utilizado, haja vista que a calcita sem aquecimento no processo de produção cimentícia também é incorporada ao cimento; e/ou II) da reação bioquímica entre o lactato, o oxigênio e a bactéria *Bacillus cereus*.

Como as placas das duas espécies restantes de *Bacillus* não obtiveram o similar resultado, uma possibilidade é de que os 18% de carbonato provieram em maior parte da reação bioquímica. Seja pela formação de compostos intermediários aditivos na cristalização e oriundos da biorreação, respeitando uma hipótese do estado pseudoestacionário (FOGLER, 2013), seja por elevada(s) constante(s) da biorreação.

O fato da não formação de cristais em placas com outras espécies de *Bacillus* não significa dizer que essas espécies não apresentem um potencial microbiológico para a autorregeneração de bioconcretos. Apenas que sob as condições aplicadas não houve uma efetiva cristalização.

4.1.2 Seleção de tipos de cimento

Selecionado o micro-organismo *B. cereus*, utilizou-se essa bactéria nos ensaios com variação de 3 tipos diferentes de cimento (CP II-E, CP II-F e CP II-Z) com quantidades de lactato de cálcio de 1,74, 3,00 e 4,26 g, totalizando 9 ensaios.

Nessa seleção, apenas nos ensaios com cimento do tipo CP II-E houve uma formação pseudocristalina, como pode ser vista na Figura 14 e na Figura 15. Essa formação visivelmente não foi um cristal completo por apresentar-se como um sólido amorfo e com uma aparência úmida. A partir da definição sobre o que é ser um cristal, “um sólido com arranjo ordenado de átomos ou moléculas, numa repetitiva matriz” (GUARDANI; SECKLER; GIULIETTI, 2020), pode existir um pseudopolimorfismo do CaCO_3 pelo sólido ser amorfo ou por conter moléculas de água agregadas ao cristal. Tanto que a maior função do cimento do tipo CP II-E é reduzir o desprendimento de calor, como foi verificado no subtópico 2.1.1 sobre cimento, possibilitando o acúmulo de água por mais tempo nas placas de Petri e conseqüentemente tendo uma maior probabilidade de formação de solvatos.

Figura 14 – Seleção de diferentes tipos de cimento para a bactéria *Bacillus cereus*

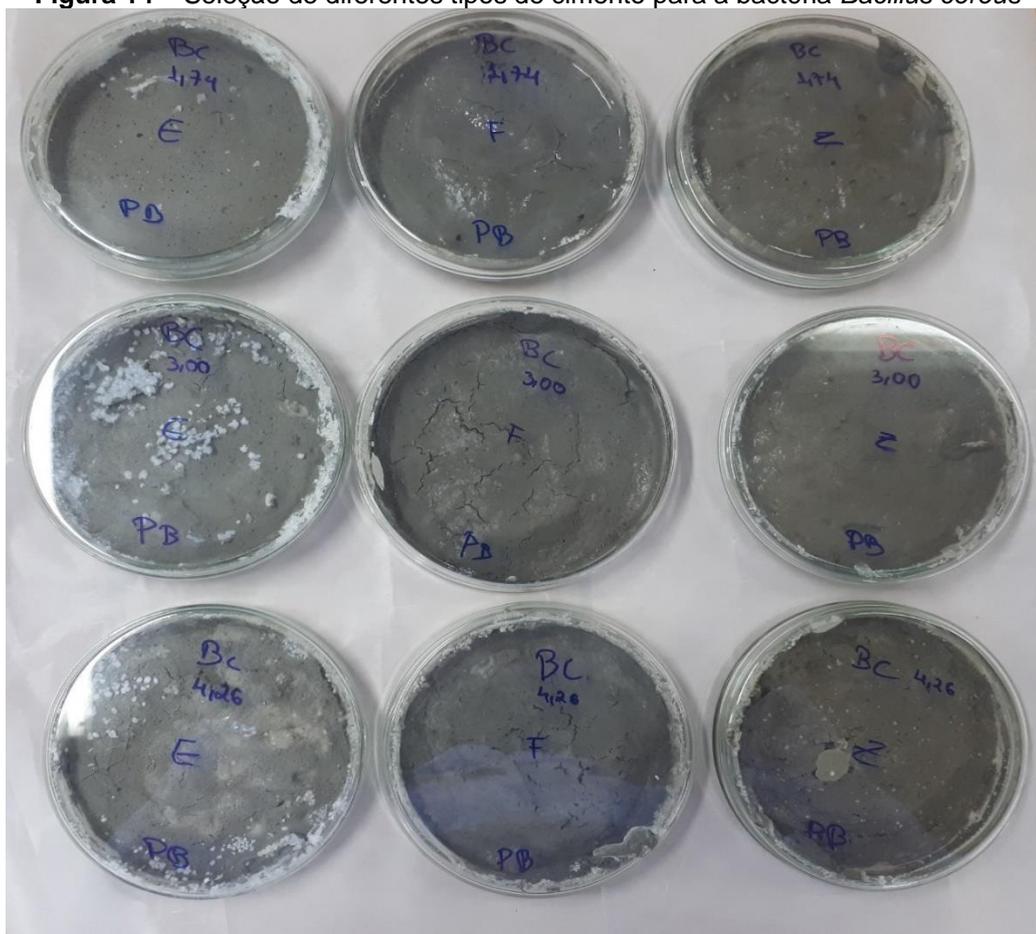
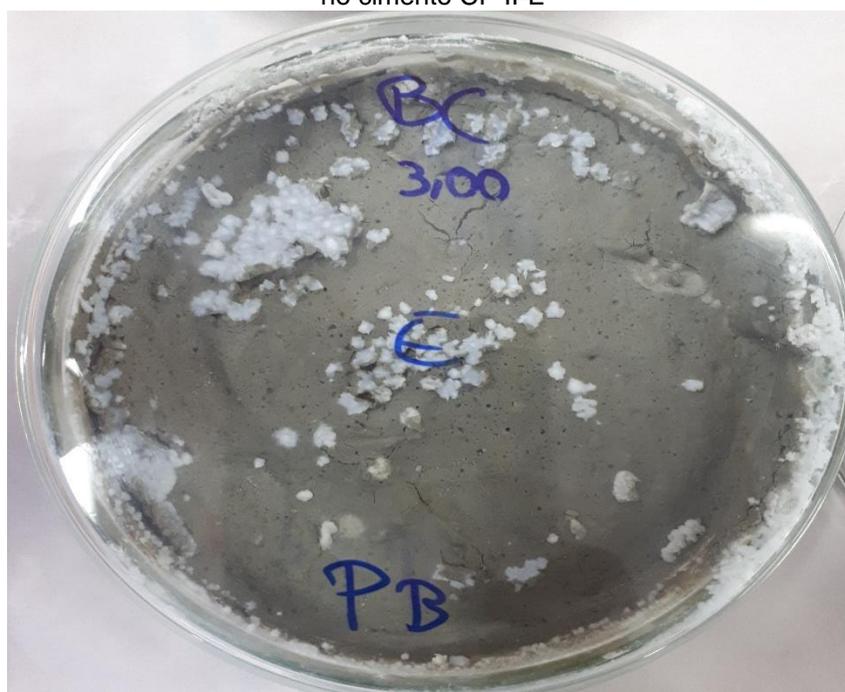


Figura 15 – Placa de petri com indicações de pseudocristais no cimento CP II-E

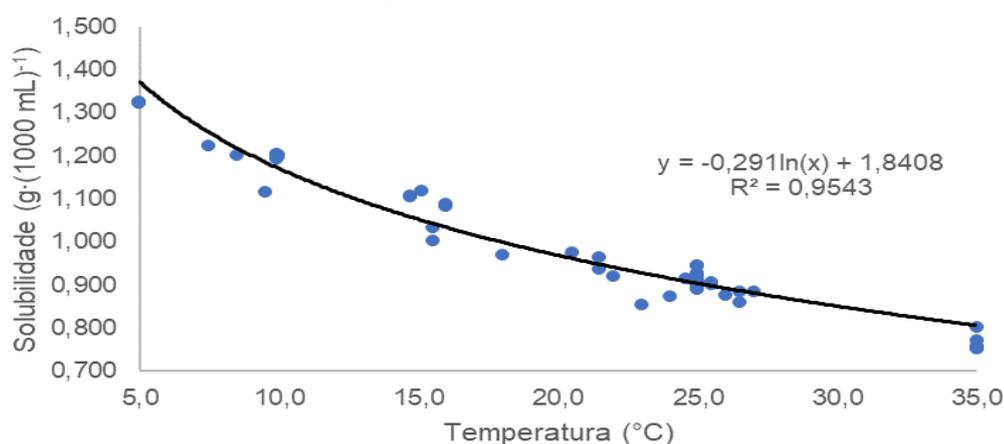


Outro ponto relevante sobre a Figura 14 e a Figura 15 é que no aumento da quantidade de lactato de 3,00 para 4,26 g, houve uma redução da quantidade de pseudocristais possivelmente formados. Portanto, a hipótese mais provável é que tenha havido um erro humano de homogeneização da mistura cimentícia, reforçando a necessidade de um equipamento como uma betoneira que deixe essa mistura padrão e que não haja pontos de acúmulo de determinados componentes como o lactato no cimento.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE SOLUBILIDADE DA CALCITA

A partir dos dados de Visscher e Vanderdeelen (2011), foram coletados os 60 pares de dados no Anexo I e foi plotado na Figura 16.

Figura 16 – Curva de solubilidade obtida dos dados de Visscher e Vanderdeelen (2011) para variações entre 5 e 35°C da calcita



Adaptado de Visscher e Vanderdeelen (2011)

O primeiro ponto a ser discutido é sobre a confiabilidade da fonte dos dados. Como mencionado anteriormente, a renomada instituição IUPAC dispõe de mais de 100 volumes de trabalhos apenas sobre a solubilidade dos compostos químicos. O trabalho de Visscher e Vanderdeelen (2011) corresponde ao volume 95, parte B, dessa coletânea e discute a solubilidade dos polimorfos de carbonato de cálcio em 137 páginas de tabelas, gráficos e explicações.

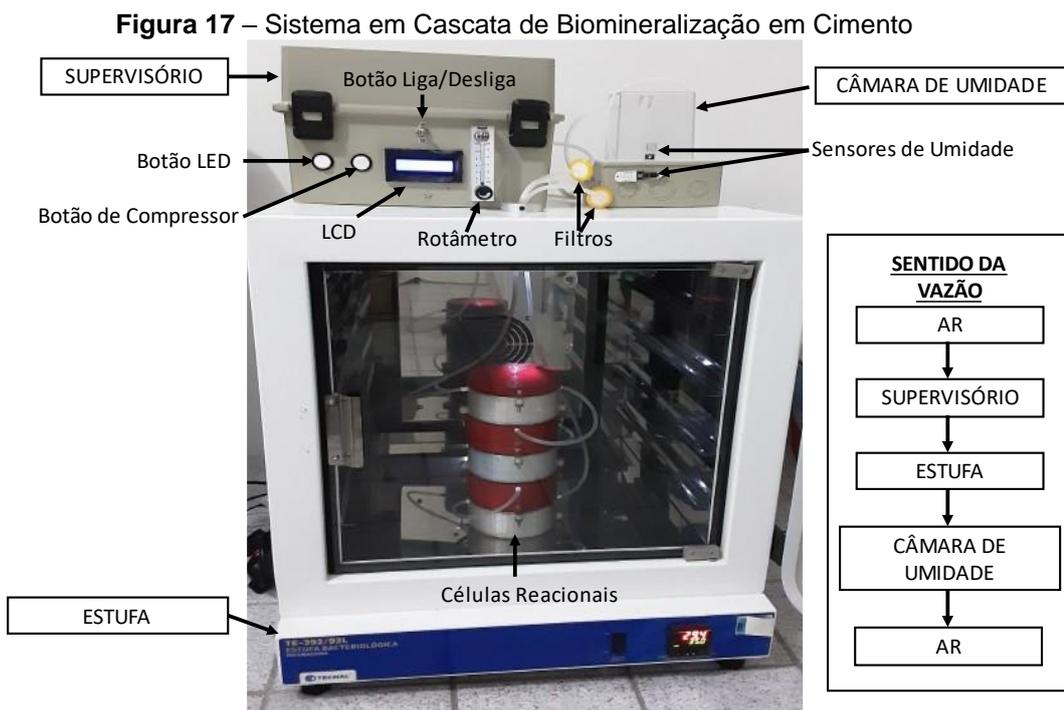
O segundo ponto abordado refere-se à curva logarítmica com um índice de regressão linear (R^2) de 95,4%, indicando que os 60 pares de dados estão em consonância com a curva, cujo modelo foi aplicado para a faixa de temperaturas entre 5 e 35°C, com passo de 1°C.

4.3 SISTEMA EM CASCATA DE BIOMINERALIZAÇÃO EM CIMENTO

A partir dos dados da curva de solubilidade da calcita, os parâmetros de solubilidade associados à temperatura foram utilizados nos experimentos de cristalização no SCBC.

4.3.1 Etapa de engenharia de processo

O Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento é apresentado na Figura 17 com o supervisor, a estufa e os sensores de umidade.



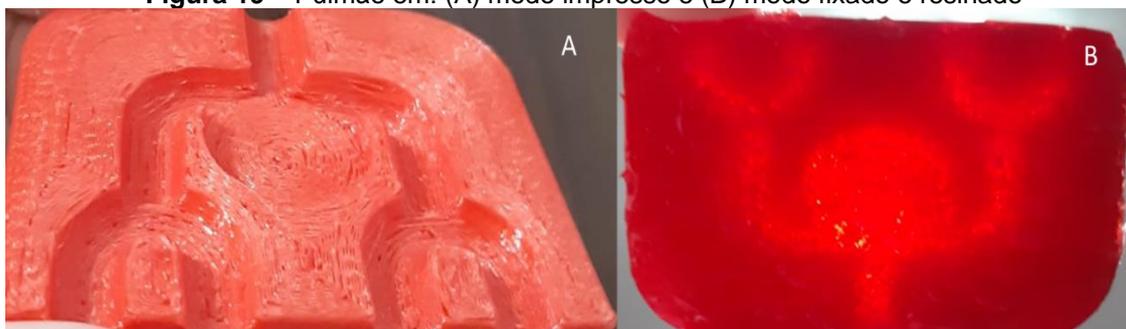
As células reacionais de PETG são apresentadas na Figura 18 com um tempo unitário (cada célula) para impressão de 15 horas e 9 minutos, totalizando 75 horas e 45 minutos para as 5 células reacionais, além da tampa (cerca de 2 horas) e do tempo de resinagem e secagem.

Figura 18 – Células reacionais de PETG do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento



O pulmão do compressor, utilizado para unir as 4 saídas, é apresentado de modo impresso (Figura 19A) e de modo fixado e resinado (Figura 19B). Cada metade do pulmão obteve um tempo de produção na impressão 3D de 1 hora e 47 minutos.

Figura 19 – Pulmão em: (A) modo impresso e (B) modo fixado e resinado



Alternativamente, as células reacionais de vidro foram também construídas e foram preferidas no decorrer dos experimentos, exceto no teste de secagem com água destilada, por duas razões: I) visibilidade do interior da célula reacional e II) facilidade de estanqueidade em relação às células de PETG. A célula reacional de vidro pode ser visualizada na Figura 20.

Figura 20 – Célula reacional de vidro do Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento



Segundo Noor *et al.* (2019), um coração microvascularizado foi sintetizado através da combinação da impressão 3D de resina e de processos de microencapsulamento, podendo resultar no futuro do fim das filas de espera para transplante de órgãos, demonstrando a relevância da ferramenta impressão 3D. Nas células reacionais desenvolvidas, uma opção para reduzir alguns pontos de vazamento de ar nas células reacionais de PETG seria a troca da forma de impressão: de filamento fundido para resina. Apesar da resina não apresentar tanta resistência como alguns filamentos, alguns processos não requerem um nível altíssimo de resistência, mas de estanqueidade. Outro ponto relevante é que o processo de fabricação de células reacionais por resina pode ter espaço para visores do tipo folhas de acetato (como foram utilizados na época da pandemia) de forma ao usuário enxergar o que está acontecendo na célula reacional.

Higueiras, Calero, Collado-Montero (2021) fizeram um escaneamento de um ornamento da Roma Antiga que estava desgastado pelo intemperismo da época. Através desse detalhamento, os autores constataram as partes necessárias para restauração e, por simetria do ornamento, puderam reconstruir a obra de arte. Esse trabalho demonstrou como é importante a impressão 3D para níveis de detalhamento como diferentes níveis de diâmetro e altura de célula reacional.

4.3.2 Etapa instrumental, elétrica e de programação

Os sensores de umidade foram dispostos de modo que a umidade proveniente das células reacionais só atingisse um dos sensores em uma cúpula transparente para avaliar a leitura da umidade interna. O outro sensor foi disposto afastado do alcance da umidade proveniente das células reacionais.

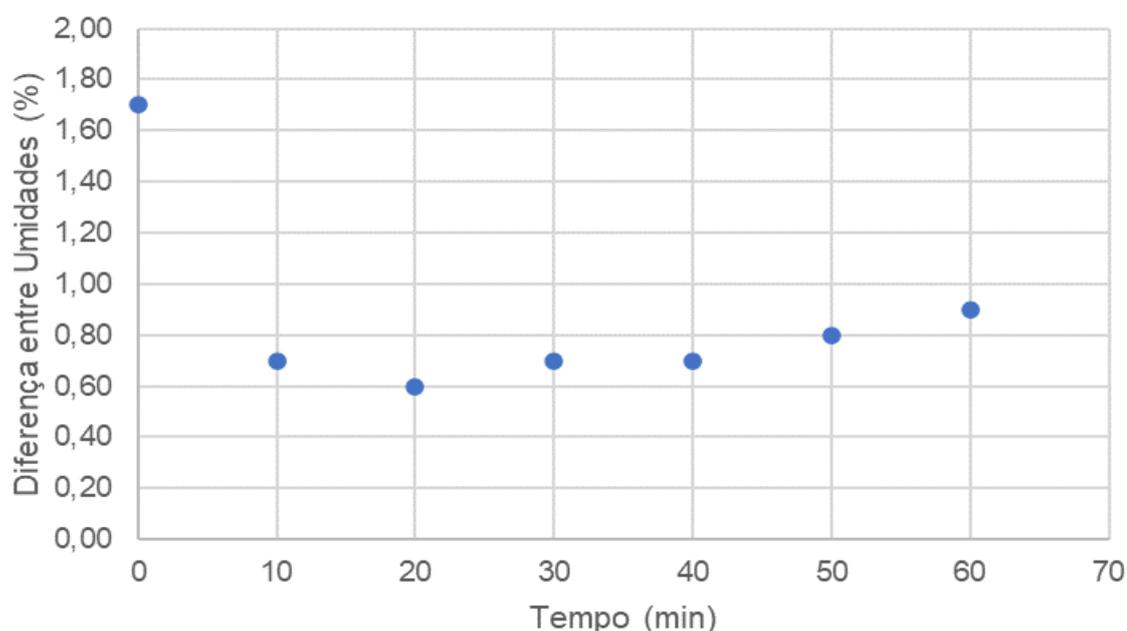
Outros dois aspectos também importantes sobre a diferença entre umidades são as faixas de medição de umidade e a acurácia dos sensores.

Há alguns sensores que medem de 20 a 90% de umidade, mas a depender das condições climáticas e dos sistemas analisados, a umidade pode estar acima de 90%. O sensor DHT22 apresenta uma faixa de variação de umidade entre 0 e 100%.

Esses sensores, que apresentam uma variação de umidade entre 20 e 90%, têm uma acurácia de 5% para mais ou para menos, enquanto que o DHT22 apresenta uma acurácia de 2% para mais ou para menos. Isso significa que a diferença entre umidades poderia ter uma propagação do erro de até 10% (duas vezes 5%) com os dois sensores com menor acurácia, enquanto que os dois sensores utilizados DHT22 apresentam uma propagação do erro de até 4% (duas vezes 2%).

Por isso, para testagem dessa acurácia, foram comparadas as diferenças de umidades entre os dois sensores DHT22 durante o período de 60 min, em passos de 10 min, conforme é visualizado na Figura 21.

Figura 21 – Comparação de erros das diferenças entre umidades sem a ativação do compressor no Sistema em Cascata de Biomineralização em Cimento



Os erros não ultrapassam nem a metade do erro propagado, ressaltando a confiabilidade dos sensores.

O código da programação para o supervisor (Apêndice B) auxiliou na medição das umidades, na diferença entre umidades e na transformação dessa diferença no módulo do valor (valor sempre positivo) de modo a condizer fisicamente com o processo.

Os testes de secagem dos 100 mL de volume nas células reacionais de PETG apresentaram um tempo de secagem de $99,83 \pm 0,05$ h com uma taxa de secagem de $1,01 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Esse teste inicial foi importante para entender de onde partir no Planejamento Fatorial.

A potência total do SCBC teve como componentes: 1 estufa (250 W), 1 Arduino UNO R3 (10 W), 1 LED (0,01 W), 2 sensores de umidade ($2 \cdot 0,014$ W) e 1 um compressor (12 W), totalizando 272 W. Essa potência comparada a equipamentos de uso comum é menor do que computadores de uso pessoal, cuja potência é de 300 W. Em outras palavras, realizar experimentos cinéticos no SCBC tem um menor custo energético do que usar um computador e ainda auxilia a tornar o processo de autorregeneração do concreto mais rápido.

Kondaveeti *et al.* (2021) ressaltam as vantagens de utilização das placas de Arduino pelo baixo custo tanto das placas, quanto dos kits, pela multifuncionalidade do software, pela grande quantidade de sensores, pelo processamento rápido das informações e pela baixa energia requerida. Ademais, esses microcontroladores podem ser utilizados em diversas áreas como automação residencial, educação de robótica, segurança e muitas outras.

Poh *et al.* (2021) construíram um espectrofotômetro UV-Visível portátil com uma placa de Arduino, um módulo bluetooth e alguns sensores. O resultado foi a construção de um equipamento que pode ser transportado para qualquer lugar, mais barato e com similar acurácia comparado com equipamentos tradicionais.

Brasileiro *et al.* (2020) construíram um protótipo para captar imagens de microbolhas em movimento com a combinação de uma câmera GoPro associada a lentes de microscópio ocular e objetiva com a união entre essas peças por peças de impressão 3D. Além de realizarem o controle de bomba e de sensores de vazão por uma central de controle do Arduino UNO R3. Logo, a associação entre a impressão 3D e o microcontrolador Arduino é uma excelente combinação.

Roque *et al.* (2023) simularam duas formas de geometria de aeração nas células reacionais do SCBC: a primeira com entradas e saídas horizontais (como foi realizado o ensaio experimental dessa tese) e a segunda nas entradas e saídas verticais. Segundo a Fluidodinâmica Computacional, com validação de malha, foi possível perceber que a melhor distribuição do ar, apesar da variação de posição feita também por um DCCR, a melhor geometria para o processo de aeração foi aquela com entradas e saídas de aeração horizontais.

4.3.3 Planejamento fatorial para secagem do carbonato de cálcio

Após a realização dos 18 ensaios, tendo como parâmetro de resposta o tempo (h) para secar toda a água, a quantidade de carbonato de cálcio (mg) foi calculada através da concentração de carbonato e do volume de 10 mL em cada célula reacional, dividida pelo tempo de secagem (h). Logo, foi calculada em cada ensaio a taxa de produção de carbonato de cálcio por secagem. O ensaio 15 foi registrado na Figura 22.

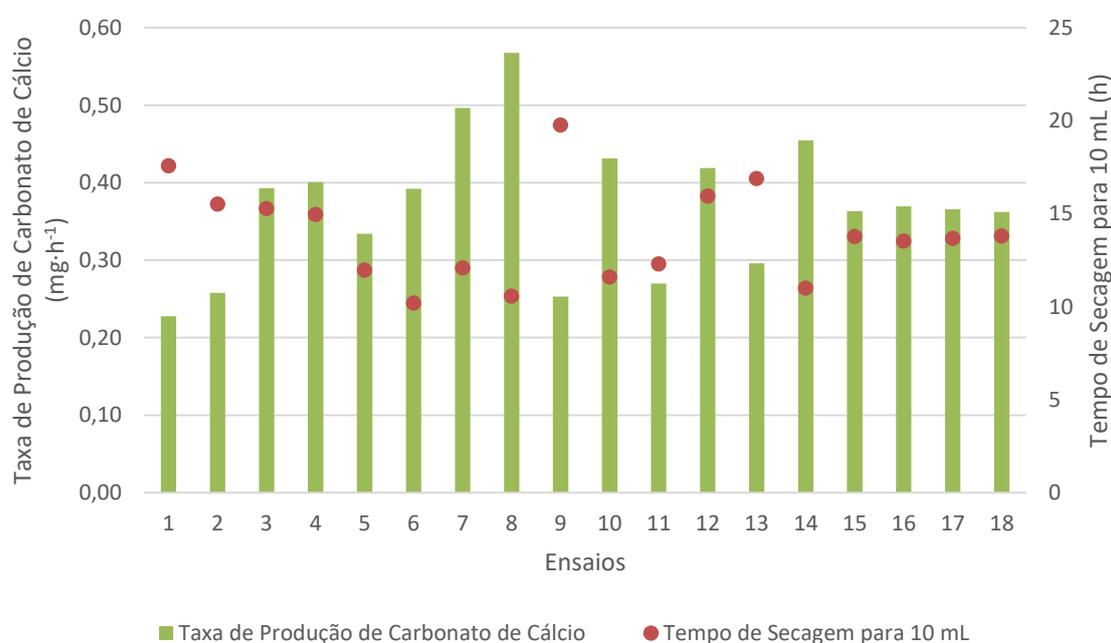
Figura 22 – Ensaio 15 do planejamento fatorial de secagem



Na Figura 23, são representados os valores nos 18 ensaios da taxa de produção de carbonato de cálcio e do tempo de secagem. A partir dos valores obtidos,

é possível observar para o tempo de secagem que o mínimo e o máximo tempos foram de 10,20 e 19,77 h para os ensaios 6 e 9, respectivamente. Enquanto que para o ensaio 6 foram utilizados os 3 pontos axiais, para o ensaio 9 foram utilizados 1 ponto cúbico (aeração de $1,16 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) e 2 pontos axiais, refletindo que a aeração pode apresentar uma maior influência no tempo de secagem em relação à temperatura e à concentração nesses dois pontos. No caso da taxa de produção, os valores mínimo e máximo encontrados foram de $0,23$ e $0,57 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ para os ensaios 1 e 8, respectivamente. Todos os pontos analisados para esses valores de mínimo e máximo da taxa de produção de carbonato foram axiais.

Figura 23 – Resultados do tempo e da taxa de produção de carbonato de cálcio no planejamento fatorial de secagem



Na Tabela 4, são apresentados os efeitos estimados para o planejamento de secagem. Essa Tabela indica quais são os efeitos que cada variável ou cada interação de variáveis vão estatisticamente alterar o resultado da taxa de produção de carbonato. Na Tabela 5, a análise de variância (ANOVA) tem a função de comparar as médias dos efeitos e das interações com a falta de ajuste e o erro puro para afirmar se a influência é real ou ao acaso.

Tabela 4 – Efeitos estimados para planejamento fatorial de secagem de soluções de carbonato de cálcio

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(3)	Valor-p	-95% Intervalo de Confiança	+95% Intervalo de Confiança
Média	0,36153	0,00104	347,56478	0,00000	0,35822	0,36484
Aeração (L·min ⁻¹ , Linear)	0,11884	0,00180	66,00518	0,00001	0,11311	0,12457
Concentração de Carbonato de Cálcio (mg·L ⁻¹ , Linear)	0,13141	0,00180	72,98478	0,00001	0,12568	0,13714
Temperatura (°C, Linear)	0,06365	0,00180	35,35424	0,00005	0,05792	0,06938
Temperatura (°C, Quadrático)	0,02123	0,00180	11,76437	0,00132	0,01548	0,02697
Aeração (L·min ⁻¹ , Linear) · Concentração de Carbonato de Cálcio (mg·L ⁻¹ , Linear)	0,00749	0,00235	3,18478	0,04991	0,00001	0,01497
Aeração (L·min ⁻¹ , Linear) · Temperatura (°C, Linear)	0,02275	0,00235	9,67664	0,00234	0,01527	0,03024

Tabela 5 – Análise de variância para planejamento fatorial de secagem de soluções de carbonato de cálcio

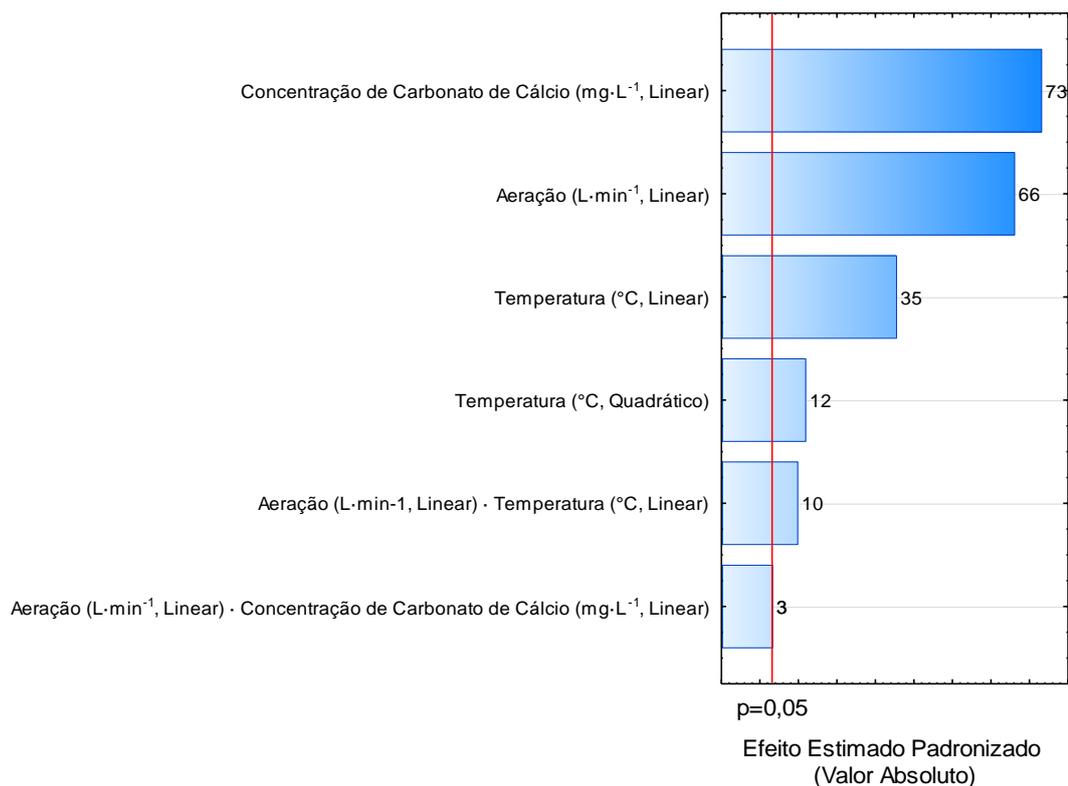
Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	Valor p
Aeração (L·min ⁻¹ , Linear)	0,04818	1	0,04818	4356,68	0,00001
Concentração de Carbonato de Cálcio (mg·L ⁻¹ , Linear)	0,05890	1	0,05890	5326,78	0,00001
Temperatura (°C, Linear)	0,01382	1	0,01382	1249,92	0,00005
Temperatura (°C, Quadrático)	0,00153	1	0,00153	138,40	0,00132
Aeração (L·min ⁻¹ , Linear) · Concentração de Carbonato de Cálcio (mg·L ⁻¹ , Linear)	0,00011	1	0,00011	10,14	0,04991
Aeração (L·min ⁻¹ , Linear) · Temperatura (°C, Linear)	0,00104	1	0,00104	93,64	0,00234
Falta de Ajuste	0,01024	8	0,00128	115,71	0,00120
Puro Erro	0,00003	3	0,00001	-	-
Soma Quadrática Total	0,13385	17	-	-	-

Na Tabela 4, foram desconsiderados os efeitos quadráticos de aeração e concentração de carbonato de cálcio e a interação de concentração de carbonato com temperatura por apresentarem um valor p acima de 0,05. O valor p representa a probabilidade de significância de uma hipótese de um teste estatístico como o planejamento fatorial ser verdadeira ou ser rejeitada. Como o nível de significância (α) foi escolhido como 0,05, os valores p desses efeitos e dessas interações foram desconsiderados por apresentarem uma probabilidade maior do que 5%.

Se na visão unilateral de mínimo e máximo na Figura 23, a tendência era que a aeração fosse a etapa que mais influencia na secagem do carbonato de cálcio, na visão estatística, a concentração do carbonato de cálcio linear foi o fator que mais influenciou estatisticamente o processo de secagem, nas faixas estudadas. Seguido da aeração linear e da temperatura linear.

Na Tabela 5, o objetivo foi averiguar as diferenças entre as médias dos resultados da taxa de produção de carbonato de cálcio nos efeitos e nas interações. Se a partir dessas diferenças, o valor de F tabelado a partir dos graus de liberdade de efeito ou interação e de resíduo (falta de ajuste mais erro puro) é menor do que o F calculado, então essas variáveis independentes influenciam a variável dependente taxa de produção de carbonato de cálcio. No caso da comparação entre os efeitos e as interações, todos os graus de liberdade foram iguais a 1 (numerador) e os graus de liberdade da soma entre a falta de ajuste e o erro puro foram iguais a 8 (denominador). Esses graus de liberdade aplicados à Tabela F resultam em 5,32, que é um valor menor em relação a todos os F calculados. Logo, todas as diferenças entre médias influenciam de modo real a taxa de produção de carbonato de cálcio.

Na Figura 24, está o Diagrama de Pareto para os efeitos estimados verificados na Tabela 4. Os números expressos no Diagrama são os efeitos estimados divididos pelos erros padrões correspondentes.

Figura 24 – Diagrama de Pareto para o planejamento experimental de secagem

Normalmente em um único planejamento fatorial não é indicado formular modelos matemáticos, mas este DCCR apresentou valores p em quase todos os efeitos e interações e também apresentou a tabela ANOVA com variâncias que demonstraram exercer uma considerável influência na taxa de produção de carbonato de cálcio $TP_{\text{Carbonato}}$. Portanto, a partir dos efeitos estimados foi gerada a Equação 12, que compara a $TP_{\text{Carbonato}}$ com a aeração (A), a concentração de carbonato ($C_{\text{Carbonato}}$) e a temperatura (T).

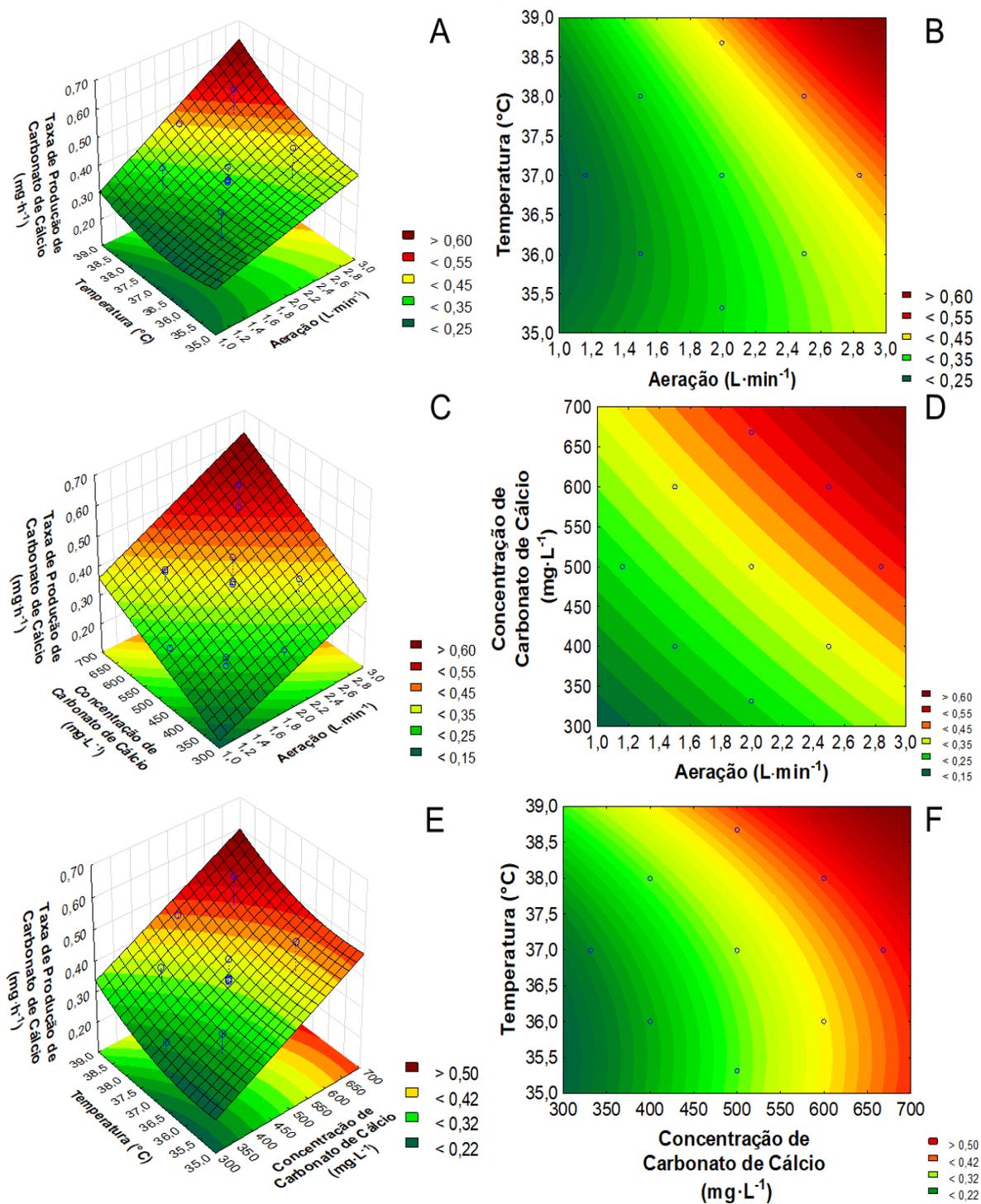
$$TP_{\text{Carbonato}} = 14,90498 - 0,76048 \cdot A + 0,00051 \cdot C_{\text{Carbonato}} - 0,79901 \cdot T + 0,01061 \cdot T^2 + 0,00007 \cdot A \cdot C_{\text{Carbonato}} + 0,02275 \cdot A \cdot T \quad (12)$$

Geralmente, os valores de cada termo da Equação 12 seriam reduzidos para duas casas decimais, de modo a tornar o modelo mais simplificado visualmente, contudo ao observar o termo do modelo para $C_{\text{Carbonato}}$ (que é o fator de maior influência sobre a variável resposta) percebe-se que esse termo seria zerado, caso arredondado.

A partir do modelo da Equação 12, foram gerados na Figura 25 os gráficos de superfície de resposta tridimensionais com as respectivas curvas de contorno apenas para melhor visualização. Os parâmetros médios das variáveis de entrada foram

ajustados no ponto central para cada combinação de 2 variáveis independentes, haja vista que olho humano só consegue enxergar em 3 dimensões.

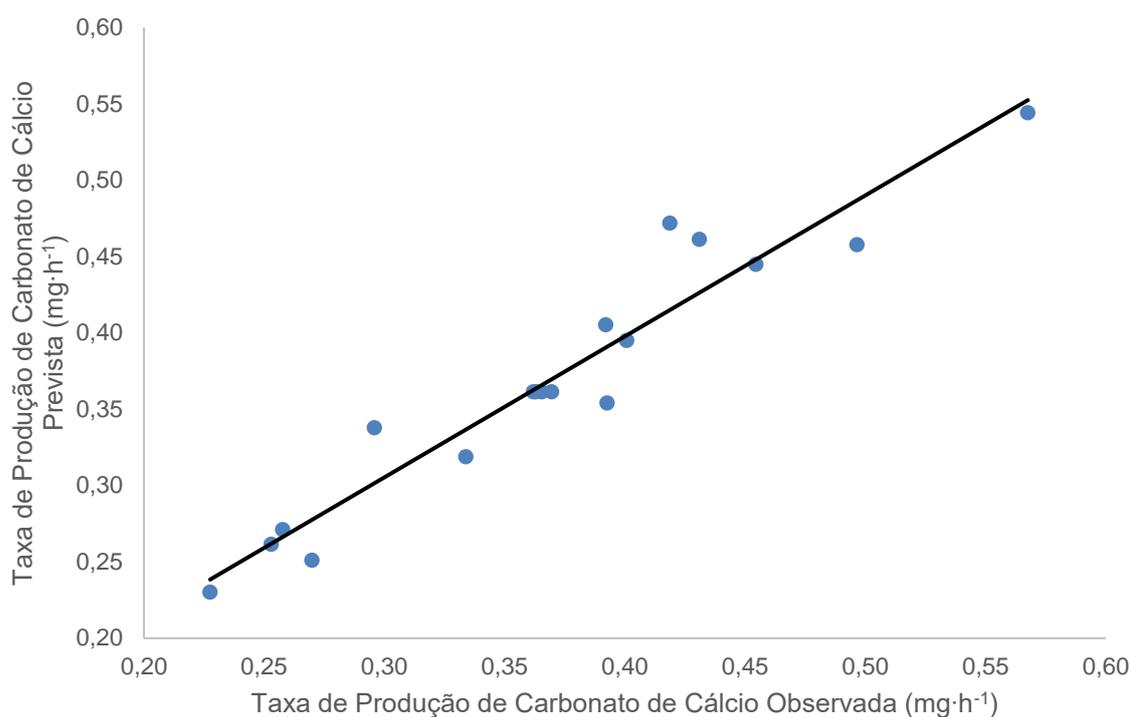
Figura 25 – Gráficos de superfície de resposta tri e bidimensionais com as variações entre temperatura e aeração 3D (A) e 2D (B), entre concentração de carbonato de cálcio e aeração 3D (C) e 2D (D) e entre temperatura e concentração de carbonato de cálcio 3D (E) e 2D (F)



A partir da Figura 25, pode ser constatado que o aumento das 3 variáveis contribuiu para o aumento da taxa de produção de carbonato, que é inversamente proporcional ao tempo de secagem. Assim como o inverso: a redução das 3 variáveis também reduz a similar taxa de produção.

A partir desse modelo proposto, na Figura 26 são apresentados os valores experimentais e previstos na Equação 12 da taxa de produção de carbonato de cálcio. O índice de regressão linear (R^2) para essa comparação é de 92,3%.

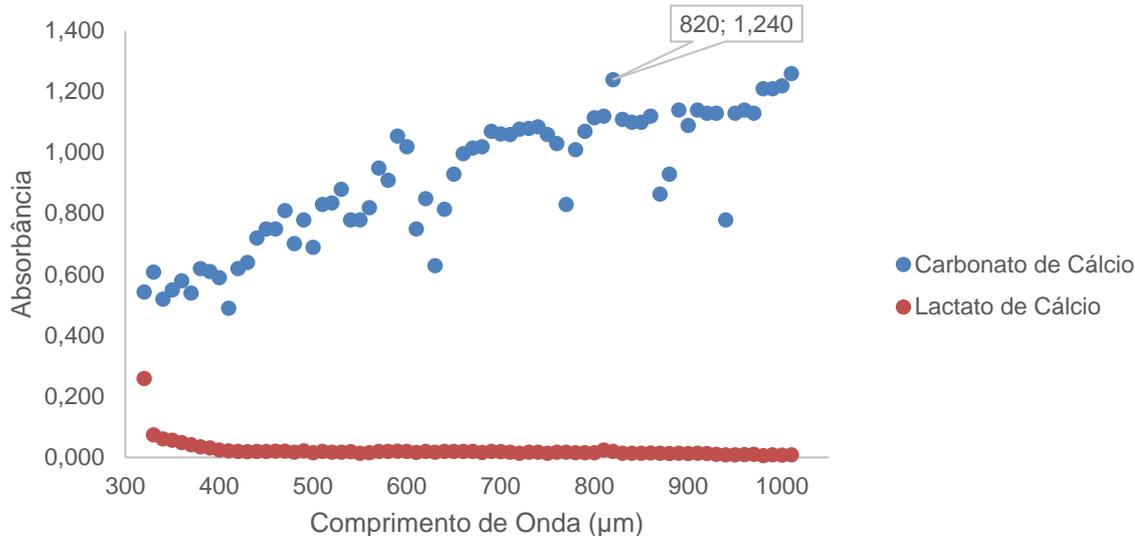
Figura 26 – Taxas de produção de carbonato de cálcio no planejamento experimental de secagem previstas e observadas



4.3.4 Varredura do comprimento de onda e determinação da curva de calibração do carbonato de cálcio

Após as duas análises das soluções de $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbonato e lactato de cálcio no espectrofotômetro entre 320 e $1010 \mu\text{m}$, com passo de $10 \mu\text{m}$, a Figura 27 apresenta as variações entre as absorvâncias dos sais em água.

Figura 27 – Varreduras entre as absorvâncias de soluções de $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbonato de cálcio e lactato de cálcio



Os dados da Figura 27 podem ser conferidos no Apêndice C. Nesse gráfico, percebe-se que de 330 a 1010 μm , houve uma grande variação entre as absorvâncias das duas soluções, exceto pelo comprimento de 320 μm , sendo a solução de carbonato a que apresentou as maiores absorvâncias. Os dois maiores picos foram a 820 e 1010 μm com absorvâncias respectivamente de 1,240 e 1,260 para o carbonato de cálcio.

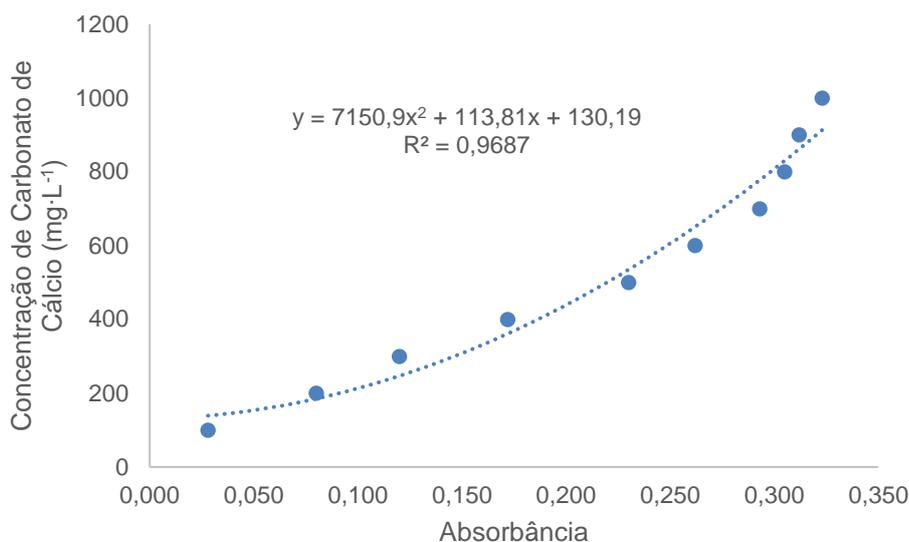
As absorvâncias nesses comprimentos de onda para o lactato de cálcio foram de 0,020 e 0,009, respectivamente. Pela diferença entre absorvâncias pode-se concluir que há uma clara distinção pela espectrofotometria entre os dois sais a $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Entre os dois maiores comprimentos de onda, foi escolhido o segundo maior porque trabalhar com algum equipamento no limite da faixa operacional nunca é recomendado.

Com o comprimento de onda definido em 820 μm , a Tabela 3 foi utilizada para o preparo das soluções de carbonato de cálcio entre 1 e $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Esses ensaios resultaram na Tabela 6 com as seguintes absorvâncias.

Tabela 6 – Ensaio de absorvância de acordo o preparo de soluções

Ensaio	Absorvância	Concentração de Carbonato de Cálcio (mg·L ⁻¹)
1	0,323	1000
2	0,312	900
3	0,305	800
4	0,293	700
5	0,262	600
6	0,230	500
7	0,172	400
8	0,120	300
9	0,080	200
10	0,028	100
11	0,026	90
12	0,025	80
13	0,014	70
14	0,017	60
15	0,016	50

A partir do ensaio 11 da Tabela 6, percebeu-se que os valores da absorvância começaram a ficar muito próximos. Algumas concentrações mais baixas tiveram as absorvâncias maiores em relação a soluções de concentrações mais elevadas. Por exemplo, o ensaio 14 apresentou uma absorvância maior em relação ao ensaio 13. Dessa forma, preferiu-se contabilizar a curva a partir da concentração do ensaio 10, numa concentração de 100 mg·L⁻¹. Logo, a Figura 28 representa a curva de calibração do carbonato de cálcio.

Figura 28 – Curva de calibração para análise de carbonato de cálcio em água

4.3.5 Cinética de crescimento da bactéria *Bacillus cereus* no SCBC

A curva cinética de crescimento de cada micro-organismo é importante para determinar o comportamento desse micro-organismo ao longo de um período. A síntese do produto (carbonato de cálcio) também deve ser investigada porque deve acompanhar o perfil de crescimento microbiano. O pH é um agente coadjuvante para confirmar a conversão de um reagente para um produto. No caso da biorreação química de conversão pela bactéria *B. cereus* de lactato em carbonato no SCBC (Equação 6), como o volume é variável pela secagem em cada célula reacional, em vez das concentrações de carbonato de cálcio e de biomassa, foram calculadas as massas de cada uma dessas concentrações. A Figura 29 mostra as 5 células reacionais preparadas para as 120 h de cinética.

Figura 29 – Células reacionais de vidro preparadas para a cinética da bactéria *Bacillus cereus*



Logo, na Figura 30A são apresentadas as curvas de crescimento do *B. cereus* (mg), de síntese de carbonato e de pH. Na Figura 30B, é apresentada a curva de taxa de produção de carbonato ($\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$). Na Figura 31, é representada a biomassa sendo

identificada após a centrifugação no interior do Tubo de Falcon e, na Figura 32, as biomassas do tempo de 24 e 120 h são comparadas.

Figura 30 – Curva de crescimento microbiano da bactéria *Bacillus cereus* com (A) a massa de carbonato de cálcio, o pH e a biomassa e (B) a taxa de produção de carbonato de cálcio

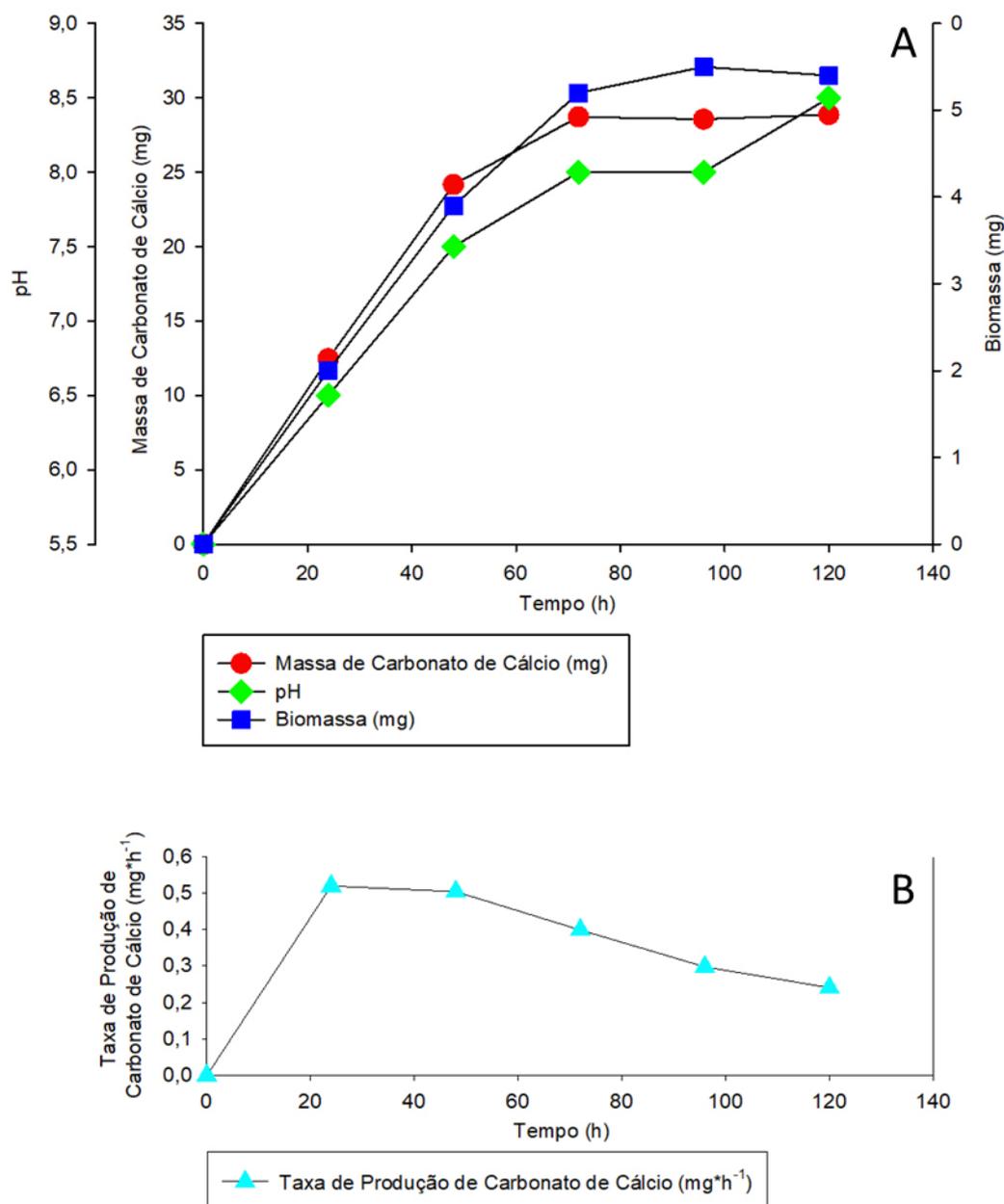


Figura 31 – Tubo de Falcon contendo (A) solução centrifugada e (B) biomassa após retirada do sobrenadante

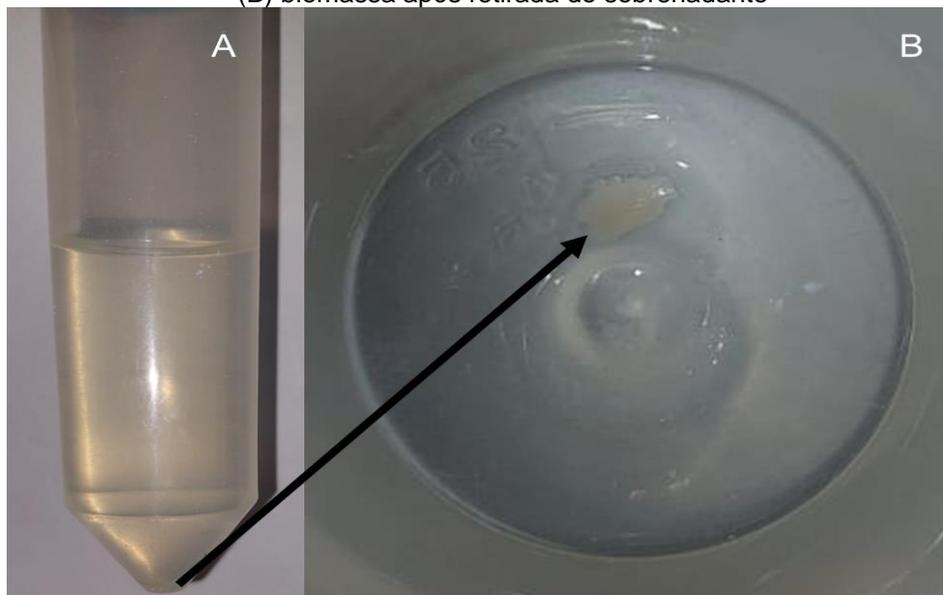
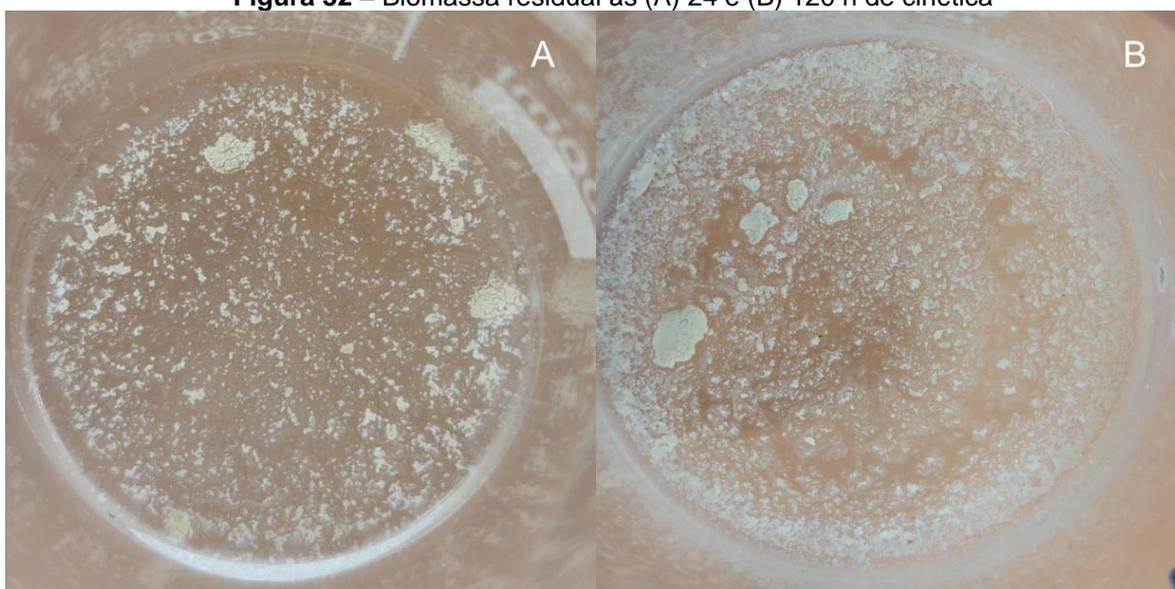


Figura 32 – Biomassa residual às (A) 24 e (B) 120 h de cinética



Na Figura 30A, as 3 grandezas mensuradas apresentam perfis semelhantes, sendo possível identificar as fases de crescimento celular (log) e estacionária. A transição entre essas duas fases ocorre às 72 h em todas as 3 curvas da Figura 30A, indicando que após esse período a bactéria *B. cereus* não identificou as condições necessárias para nutrição e consequente síntese de carbonato de cálcio. Antes das 72 h, às 48 h, há a mudança de acidez para basicidade em relação ao pH, sendo o ponto de desaceleração da fase log e corroborando o consumo de lactato e síntese de carbonato.

Ainda na Figura 30A não foi possível identificar a fase de latência do crescimento microbiano (lag), ou seja, em que o micro-organismo está se adaptando

à mudança de pré-inóculo para inóculo, diante das escolhas dos tempos com intervalos de 24 em 24 h pela ausência de agitação. Também não foi possível identificar a fase de declínio celular, ou seja, em que a grande quantidade de biomassa frente à ausência de nutrientes resulta na redução da concentração microbiana. Essa fase não foi identificada diante do tempo máximo ser de 120 h pela quantidade de 5 células reacionais. Ambas as fases não identificadas não interferem nos fins deste trabalho, porque o intuito era identificar em quanto tempo a bactéria *B. cereus* alcançaria sua produção máxima, isto é, em quanto tempo se alcançaria a fase estacionária.

Estequiometricamente, se 100% da concentração de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactato fossem convertidos em carbonato, a solução final teria a concentração de $229 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, se, e somente se, o volume inicial fosse igual ao volume final. No processo de biorreação, houve uma variação de volume de 117 mL (78%), refletindo que essa redução de volume implica diretamente no aumento da concentração. Por essa razão as concentrações podem causar uma confusão ao apresentar valores acima de $229 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mas deve-se perceber também que os valores dos volumes estão menores. Logo, a massa de carbonato foi explicitada a partir dos valores das concentrações e dos volumes para ser comparada à massa final máxima que poderia ser alcançada na conversão de lactato em carbonato: 34,4 mg de carbonato.

A partir da cinética, pode-se perceber que os Experimentos Iniciais para o *Bacillus cereus*, que demonstraram a formação cristalina em cimento em 17 h, provavelmente foram mais influenciados pela Equação 7 (de hidróxido para carbonato), do que em relação à Equação 6 (de lactato para carbonato). Os motivos para essa seletividade ocorrer provavelmente foram a ausência de aeração no meio, apesar do experimento ter sido feito na presença de gás oxigênio; uma pequena quantidade de solução presente no cimento contendo a bactéria, que rapidamente foi seca em estufa, não possibilitando o tempo necessário para a conversão de lactato em carbonato; a acurácia do controle de temperatura na estufa de mais de $0,1^\circ\text{C}$ e a porosidade do cimento que dificultou ainda mais a Equação 6 de ocorrer. Por essas potenciais razões, tentou-se repetir os similares ensaios, mas não foram obtidos os cristais.

Outro fato relevante é observado no difratograma da Figura 13A, em que 82% dos picos se referem ao SiO_2 . Um composto não verificado em biomineralizações com bactérias da espécie *Bacillus*, mas que faz parte da composição de todos os tipos de

cimento. Possivelmente, houve *a priori* uma nucleação a partir das conversões do hidróxido (preferencialmente) e do lactato para formar o carbonato de cálcio e, desse núcleo formado, houve um crescimento molecular com as moléculas de SiO₂ presentes no cimento.

Uma hipótese em questão é sobre qual a necessidade de envolver bactérias em um processo de carbonatação da matéria orgânica, quando simplesmente poderia se realizar a secagem do carbonato no concreto. Desta forma não precisaria ter todo um controle com a biossegurança do local de trabalho. A resposta para esse questionamento é que as bactérias além de poderem reproduzir-se, apresentam o movimento browniano, que é o deslocamento ao redor de um volume de controle como um poro. Dessa forma, a probabilidade de ocorrerem poucos pontos de nucleação e muitos pontos de crescimento moleculares, mantendo algumas fissuras no concreto, deve ser menor no processo biotecnológico de carbonatação em relação à simples cristalização do carbonato no concreto.

De acordo com Durga *et al.* (2021), em um meio contendo a bactéria *B. cereus* com 5% de lactato de cálcio pentahidratado e outros sais minerais, a 35°C e com agitação de 300 rpm obteve o ponto de estabilização de curva de crescimento às 24 h, representando 1/3 do tempo necessário para a estabilização. Nesse ensaio, a agitação provavelmente foi um fator relevante para obtenção do crescimento da bactéria, no entanto prospectou-se um crescimento sem agitação de forma a tornar mais real o crescimento bacteriano.

Durga *et al.* (2021) também utilizaram dois transdutores com frequência de 150 kHz entre o corpo de prova do concreto com cura microbiana. Quanto maior a velocidade de passagem da onda no corpo de prova, menor a quantidade de fissuras e maior a regeneração. As maiores velocidades de passagem do ultrassom foram das culturas com as bactérias *B. licheniformis* e *B. halodurans*, alcançando uma velocidade de 4,0 a 4,5 km·s⁻¹ da propagação da onda, enquanto que as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* alcançaram velocidades de 2,5 e 3,5 km·s⁻¹. Logo, são cepas com maiores velocidades que podem ser utilizadas em experimentos futuros.

Sarkar *et al.* (2023) estudaram o crescimento microbiano em 30 h no meio infusão de cérebro-coração (*Brain Heart Infusion*, BHI), numa variação entre 10 e 50°C, e verificaram que entre 25 e 45°C o crescimento microbiano não variou significativamente. Assim como no trabalho de Durga *et al.* (2021), a fase de

estabilidade foi alcançada em 24 h, no entanto o crescimento microbiano neste trabalho ocorreu em meio com lactato de cálcio.

4.3.6 Determinação da etapa limitante através da taxa de produção de carbonato de cálcio

A partir dos dados cinéticos, a taxa de produção de carbonato de cálcio para o processo de biorreação foi de $0,40 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ às 72 h de processo. Depois desse tempo de análise e pela curva cinética ter entrado na fase de estabilidade, praticamente não houve variação da massa de carbonato, alcançando um rendimento de 84,5% entre a massa sintetizada na biorreação (28,5 mg) e a massa teórica máxima (34,4 mg). As condições para essa síntese foram: $35,3^\circ\text{C}$ e aeração de $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, sob uma concentração no instante das 72 h de $323 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Essa concentração às 72 h extrapola os limites do planejamento fatorial, mas considerando uma concentração de $332 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e as condições de temperatura e aeração, pode-se realizar uma substituição desses valores na Equação 12 para encontrar o valor da taxa de produção de carbonato de cálcio para a secagem. Portanto, a taxa para a secagem sob as condições cinéticas foi de $0,19 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$, sendo praticamente a metade da taxa da biorreação e, conseqüentemente, o dobro do tempo (144 h) para a secagem.

A etapa limitante do processo é a secagem para as condições estudadas e se enquadra na hipótese “b” da idealidade do processo, sendo oportuna uma otimização do processo pela redução do tempo de secagem, com aumento da taxa de produção e sem o comprometimento do rendimento da reação.

Outros ensaios com as bactérias *B. subtilis* e *B. methylotrophicus* devem ser realizados para determinar sob as similares condições qual é a etapa limitante entre as taxas de produção de carbonato de cálcio. Ademais, é preciso entender que essas etapas estão apenas sendo estudados sob a ótica isolada e sem cimento ou concreto. A porosidade e a composição de cada tipo de material podem alterar as condições de biorreação ou de secagem.

4.4 CONSTRUÇÃO DE MINIBETONEIRA PARA HOMOGENEIZAÇÃO DOS BIOCONCRETOS

Diante da dinamicidade de qualquer projeto de pesquisa, a automação da minibetoneira será posteriormente investigada devido à construção do SCBC. Como

o emprego do concreto (adicionando brita e areia) só será investigado nas suas propriedades micro e macroscópicas após a avaliação de outras possibilidades de combinação de micro-organismos, a mistura não será prejudicada

Apesar desse deslocamento de etapa de projeto, a minibetoneira foi construída na impressora Sethi3D S3 em duas metades de material PETG, conforme observado após impressão (Figura 33A) e com as duas metades justapostas (Figura 33B). A impressão de cada metade demorou cerca de 25 h. A betoneira foi revestida de resina cristal e pintada de amarelo, conforme Figura 34.

Figura 33 – Minibetoneira: (A) impressão em 3D e (B) conexão das partes

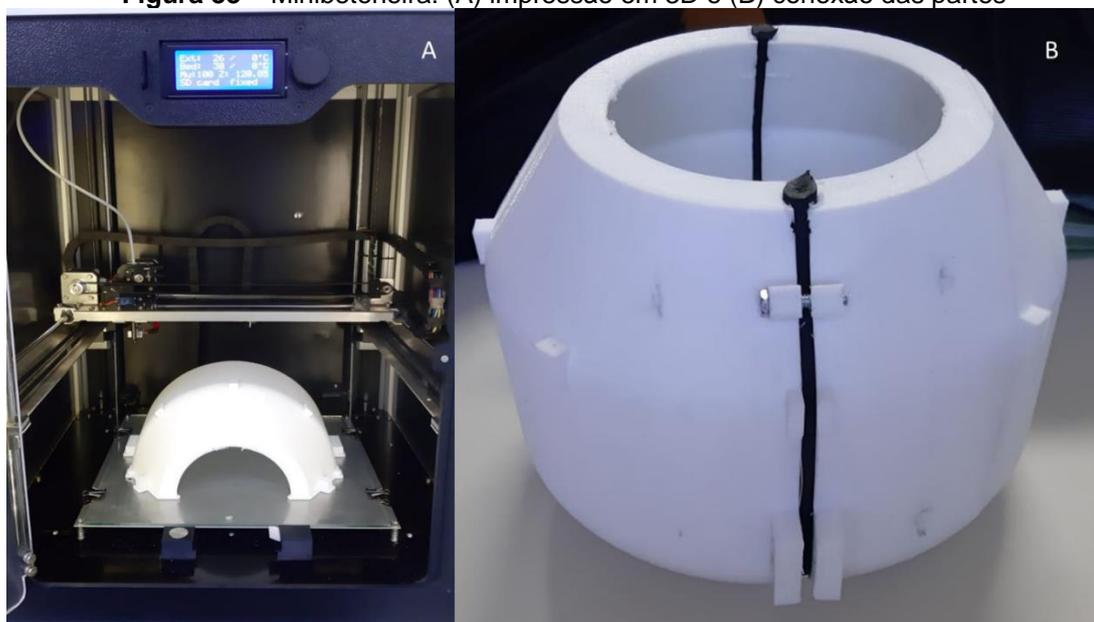
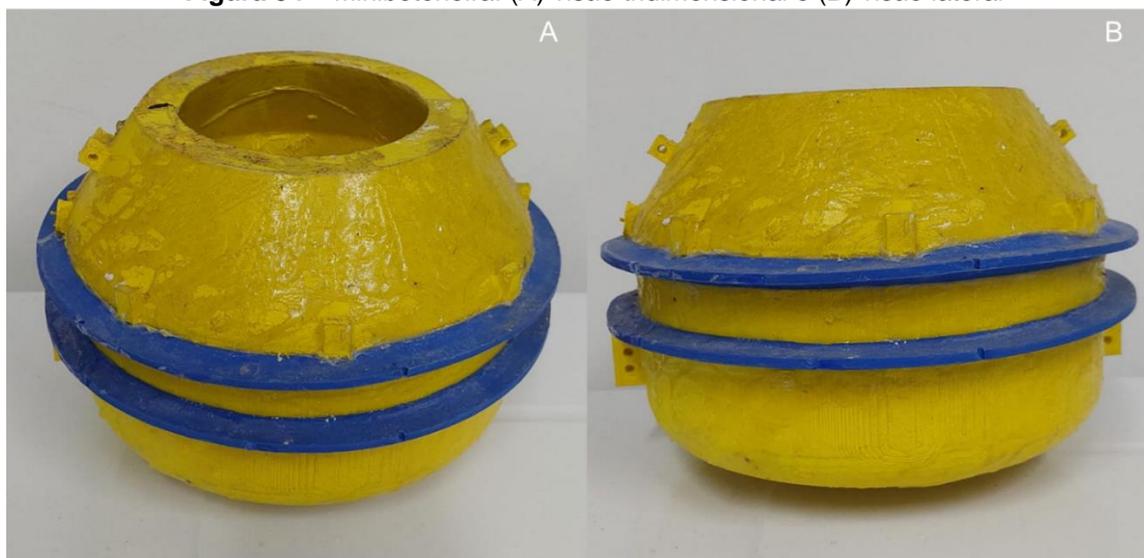


Figura 34 – Minibetoneira: (A) visão tridimensional e (B) visão lateral



5 CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÃO

O projeto enquadrado na cadeia de inovação como básico e experimental mostrou uma evolução na aquisição dos primeiros dados e na montagem de protótipos.

Os experimentos iniciais demonstraram um possível potencial microbiológico da bactéria *Bacillus cereus* para a produção de cristais de SiO_2 e CaCO_3 nas placas de cimento CP II-Z. Essa bactéria apresentou também uma maior afinidade em termos biotecnológicos para a síntese de pseudocristais em cimento do tipo CP II-E. Diante da não formação de cristais em condições similares para outras bactérias testadas (*B. subtilis* e *B. methylotrophicus*), houve a necessidade da adaptação das condições de cultivo para suprir as necessidades de aeração na conversão de lactato em carbonato.

O Sistema em Cascata para Biomineralização em Cimento foi construído com auxílio da impressão 3D para confecção das peças de suporte como o pulmão e as células reacionais em PETG e em vidro e com o auxílio do microcontrolador *Arduino UNO R3* para medição das umidades, ativação de compressor e de LED.

O planejamento experimental apresentou as 3 variáveis selecionadas como estatisticamente significativas e com médias que exerceram uma influência real na taxa de produção de carbonato de cálcio para a secagem, permitindo construir um modelo matemático, em que 92,3% dos valores observados eram descritos pelo modelo.

A cinética de crescimento apresentou um rendimento de 84,5% entre a massa observada e a massa teórica calculada às 72 h e com uma taxa de produção de carbonato de cálcio para a biorreação de $0,40 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ no início da fase de estabilidade da cinética.

A partir das condições cinéticas, foram imputados ao modelo de secagem os valores da aeração, concentração e temperatura, resultando numa taxa para biorreação de $0,19 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$. Essa taxa por ser menor do que a taxa para secagem pode ser otimizada, mas deve ser estudada para que não reduzir o rendimento ou aumentar o tempo para a produção de carbonato de cálcio na cinética. Logo, a secagem é a etapa limitante.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Outros experimentos como a variação de micro-organismos e a aplicação de cimento e concreto devem ser utilizados para verificar possíveis sinergismos e antagonismos na combinação desses fatores.

Testes com as propriedades micro e macroscópicas serão realizados para produzir bioconcretos mais resistentes do que o concreto tradicional, oferecendo subsídio para o mercado utilizar menos cimento, garantindo uma maior confiabilidade na marca das empresas e reduzindo os impactos ambientais pela redução de emissão de CO₂ para a atmosfera.

A partir das condições equilibradas entre reação bioquímica e cristalização, é possível realizar testes para a real autorregeneração do concreto tanto em locais com condições controladas de umidade, pH, aeração e temperatura e em condições em campo em diferentes regiões do planeta.

REFERÊNCIAS

ALKAYYALI, T. *et al.* Microfluidic and Cross-Linking Methods for Encapsulation of Living Cells and Bacteria - A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1053, p. 1-21, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.056>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 11582: Cimento Portland - Determinação da expansibilidade Le Chatelier**. Rio de Janeiro, 2016a. 4 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16606: Cimento Portland — Determinação da pasta de consistência normal**. Rio de Janeiro, 2018b. 8 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16607: Cimento Portland — Determinação dos tempos de pega**. Rio de Janeiro, 2018c. 4 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16697: Cimento Portland – Requisitos**. Rio de Janeiro, 2018a. 12 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5738: Concreto - Procedimento para moldagem e cura de corpos de prova**. Rio de Janeiro, 2016b. 9 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7214: Areia normal para ensaio de cimento – Especificação**. Rio de Janeiro, 2015. 4 p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **COMO FAZER EXPERIMENTOS: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 424 p.

BASTRZYK, A. *et al.* Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 174, p. 145-152, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.009>.

BRASILEIRO, P.P.F. *et al.* Construction of a microbubble generation and measurement unit for use in flotation systems. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 153, p. 212–219, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.10.028>.

BRITO, J.; KURDA, R. The past and future of sustainable concrete: A critical review and new strategies on cement-based materials, **Journal of Cleaner Production**, v. 281, p. 1-72, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123558>.

CAI, S.; MA, Z.; SKIBNIEWSKI, M.J.; BAO, S. Construction automation and robotics for high-rise buildings over the past decades: A comprehensive review. **Advanced Engineering Informatics**, v. 42, p. 1-18, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.aei.2019.100989>.

CHAGAS, E.E. Empresa – Propriedade Industrial, in: _____. (Eds.), **Direito Empresarial**, 4. ed. São Paulo: Saraiva Educação, 2018.

CHAPRÃO, M.J. *et al.* Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 15-22, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.016>.

CHEN, J.; XIANG, L. Controllable synthesis of calcium carbonate polymorphs at different temperatures. **Powder Technology**, v. 189, p. 64-69, 2009, <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2008.06.004>.

CHICA, L.; ALZATE, A. Cellular concrete review: New trends for application in construction. **Construction and Building Materials**, v. 200, p. 637-647, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.12.136>.

DALTIN, D. **TENSOATIVOS: Química, propriedades e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

DANISH, A.; MOSABERPANAH, M.A.; SALIM, M.U. Past and present techniques of self-healing incementitious materials: A critical review on efficiency of implemented treatments. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, p. 6883-6899, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.053>.

DIXIT, C.K.; KADIMISSETTY, K.; RUSLING, J. 3D-printed miniaturized fluidic tools in chemistry and biology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 106, p. 37-52, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.013>.

DURGA, C.S.S. *et al.* Comprehensive microbiological studies on screening bacteria for self-healing concrete. **Materialia**, v. 15, p. 101051, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2021.101051>.

DURVAL, I.J.B. *et al.* Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, p. 1-8, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>.

FOGLER, H.S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. Traduzido por: Verônica Calado, Evaristo C. Biscaia Jr., Frederico W. Tavares. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

FOUST, A. *et al.* **Princípios das Operações Unitárias**. Tradução por: Horácio Macedo. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

GENCK, W.J. *et al.* Liquid-Solid Operations and Equipment, *in*: GREEN, D.W. (Org.), SOUTHARD, M.Z. **PERRY'S CHEMICAL ENGINEER'S HANDBOOK**. 9. ed. New York: McGrawHill Education, 2019.

GUARDANI, R.; SECKLER, M.M.; GIULIETTI, M. Cristalização, *in*: KILIKIAN, B.V.; PESSOA JÚNIOR, A. (Orgs.), **PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2020.

HIGUEIRAS, M.; CALERO, A.I.; COLLADO-MONTERO, F.J. Digital 3D modeling using photogrammetry and 3D printing applied to the restoration of a Hispano-Roman architectural ornament. **Digital Applications in Archaeology and Cultural Heritage**, v. 20, e00179, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.daach.2021.e00179>.

HOVER, K.C. The influence of water on the performance of concrete. **Construction and Building Materials**, v. 25, p. 3003-3013, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.01.010>.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry, Solubility Data Series. Disponível em: <<https://iupac.org/what-we-do/databases/solubility-data-series/>>. Acesso em: 08 jun. 2023.

JONKERS, H.M. **Healing agent for self-healing cementitious materials**. Depositante: Technische Universiteit Delft. NL n° 2004520C2. Data de Depósito: 07 Abril 2010. Data de Concessão: 11 Out. 2011.

KANELLOPOULOS, A. *et al.* Polymeric microcapsules with switchable mechanical properties for self-healing concrete: synthesis, characterisation and proof of concept. **Smart Materials and Structures**, v. 26, p. 1-15, 2017, <https://doi.org/10.1088/1361-665X/aa516c>.

KAUR, J. *et al.* Rietveld Refinement Study of GeSb₂Te₄ Bulks Prepared Through Distinct Melting Profiles. **Materials Today Proceedings**, v. 4, p. 9524-9528, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.217>.

KEUNG, L.H. *et al.* **SELF-HEALING MATERIAL AND PREPARATION PROCESS THEREOF**. Depositante: Nano and Advanced Materials Institute Limited. US n° 9598313B2. Data de Depósito: 28 Junho 2015. Data de Concessão: 21 Março 2017.

KONDAVEETI, H.K. *et al.* A systematic literature review on prototyping with Arduino: Applications, challenges, advantages, and limitations. **Computer Science Review**, v. 40, 100364, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.cosrev.2021.100364>.

LAM, S-M.; SIN, J-C.; MOHAMED, A.R. Parameter effect on photocatalytic degradation of phenol using TiO₂-P25/activated carbon (AC). **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, 1109-1116, 2010, <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0169-8>.

LI, Z.; ZHANG, J.; ZHAO, L. **使用好氧嗜碱微生物的裂缝自修复混凝土及其制备**. Depositante: Taiyuan University of Technology. CN n° 106045400A. Data de Depósito: 03 Junho 2016. Data de Concessão: 09 Março 2018.

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, p. 93-98, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.stmat.2018.11.006>.

MARTUSCELLI, C. *et al.* Potential of Fungi for Concrete Repair. **Procedia Manufacturing**, v. 46, p. 180-185, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.03.027>.

MENGEL, L.; KRAUSS, H.; LOWKE, D. Water transport through cracks in plain and reinforced concrete – Influencing factors and open questions. **Construction and Building Materials**, v. 254, p. 1-12, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118990>.

MORS, R.M.; JONKERS, H.M. Feasibility of lactate derivative based agent as additive for concrete for regain of crack water tightness by bacterial metabolism. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 97-104, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.037>.

MULLIN, J.W. **Crystallization**. 4. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.

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, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.01.059>.

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

NOOR, N. *et al.* 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. **Advanced Science**, v. 6, p. 1-10, 2019, <https://doi.org/10.1002/advs.201900344>.

OSTENDORF, T. *et al.* Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **Journal of Biotechnology**, v. 295, p. 71-79, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.025>.

OXLEY, J.C. *et al.* Ammonium nitrate: thermal stability and explosivity modifiers. **Thermochimica Acta**, v. 384, p. 23-45, 2002, [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00775-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00775-4).

PINDELSKA, E.; SOKAL, A.; KOLODZIEJSKI, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 111-146, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014>.

POH, J. *et al.* Spectrophotometer On-The-Go: The Development of a 2-in-1 UV-Vis Portable Arduino-Based Spectrophotometer. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 325, p. 112698, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.112698>.

PORTANGUEN, S. *et al.* Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 188-198, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.023>.

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. 1-13, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119578>.

REDDY, P.V.Y.; RAMESH, B.; KUMAR, L.P. Influence of bacteria in self healing of concrete - a review. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 4212-4218, 2020b, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.07.233>.

REDDY, P.V.Y.; RAMESH, B.; MACRIN, D. Effect of crystalline admixtures, polymers and fibers on self healing concrete - a review. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p.763-770, 2020a, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.122>.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Cárita, 2009.

ROQUE, B.A.C. *et al.* Simulation Study of Hydrodynamic Conditions in Reaction Cell for Cement Biomineralization Using Factorial Design and Computational Fluid Dynamics: Prospects for Increased Useful Life of Concrete Structures and Energetic/Environmental Benefits. **Energies**, v. 16, p. 1-27, 2023, <https://doi.org/10.3390/en16083597>.

SARKAR, D. *et al.* Modelling growth of *Bacillus cereus* in paneer by one-step parameter estimation. **Food Microbiology**, 113, p. 1-9, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104231>.

SHANKS, W. *et al.* How much cement can we do without? Lessons from cement material flows in the UK. **Resources, Conservation & Recycling**, v. 141, p.441-454, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.11.002>.

SHIN *et al.* 균열 공시체의 균열폭과 자기치유 성능 시험평가를 위한 기체 확산 시험장치 및 시험방법. Depositante: Chungnam National University Industry-Academic Cooperation Foundation; Sungkyunkwan University Industry-Academic Cooperation

Foundation. KR nº 102105840B1. Data de Depósito: 16 Nov. 2018. Data de Concessão: 29 Abril 2020.

SIDDIQUE, R.; JAMEEL, A.; SINGH, M.; BARNAT-HUNEK, D.; AÏT-MOKTAR, A.; BELARBI, R.; RAJOR, A. Effect of bacteria on strength, permeation characteristics and micro-structure of silica fume concrete. **Construction and Building Materials**, v. 142, p. 92-100, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.03.057>.

SIDIQ, A.; GRAVINA, R.; GIUSTOZZI, F. Is concrete healing really efficient? A review. **Construction and Building Materials**, v. 205, p. 257-273, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.02.002>.

SINGH, G.V.P.B.; SUBRAMANIAM, K.V.L. 2019. Production and characterization of low-energy Portland composite cement from postindustrial waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 239, p. 1-12, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118024>.

SONG, T.; LEE, S.; PARK, J. 자기치유 콘크리트의 균열치유 성능 평가를 위한 투수시험방법 및 투수시험장치. Depositante: Korea Institute of Construction Technology. KR nº 101453312B1. Data de Depósito: 14 Março 2014. Data de Concessão: 22 Out. 2014.

VIJAY, K.; MURMU, M.; DEO, S.V. Bacteria based self healing concrete – A review. **Construction and Building Materials**, v. 152, p. 1008-1014, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.07.040>.

VISSCHER, A.D.; VANDERDEELEN, J. Alkaline Earth Carbonates in Aqueous Systems. **IUPAC-NIST Solubility Data Series**, v. 95, Parte 2. Ca, p. 1-137, 2011, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4704138>.

WIKTOR, V.A.C.; JONKERS, H.M. **Bio-based repair method for concrete**. Depositante: Technische Universiteit Delft and Stichting voor de Technische Wetenschappen te Utrecht. NL nº 2010818C2. Data de Depósito: 17 Maio 2013. Data de Concessão: 24 Nov. 2014.

ZHANG *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, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.07.129>.

APÊNDICE A – DADOS DO DIFRATOGRAMA OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS INICIAIS DA SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM PLACAS CIMENTÍCIAS DO *Bacillus cereus*

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
9,9985	0,0000	10,8185	-36,6700	11,6385	-6,6909
10,0185	146,9249	10,8385	-13,2046	11,6585	10,2877
10,0385	417,4524	10,8585	4,6888	11,6785	15,4070
10,0585	688,2067	10,8785	-16,1466	11,6985	23,1867
10,0785	1124,3960	10,8985	-22,8454	11,7185	12,2548
10,0985	1524,5400	10,9185	-28,8523	11,7385	-17,7560
10,1185	1966,4220	10,9385	-36,5187	11,7585	4,2750
10,1385	2114,6060	10,9585	-14,3612	11,7785	25,4204
10,1585	1828,0230	10,9785	-5,0700	11,7985	31,7348
10,1785	1297,4410	10,9985	-4,4263	11,8185	56,1363
10,1985	678,4680	11,0185	-1,3724	11,8385	60,3427
10,2185	303,5082	11,0385	-15,2595	11,8585	63,9624
10,2385	62,3747	11,0585	-31,3555	11,8785	91,1563
10,2585	-5,7310	11,0785	-33,1711	11,8985	128,1871
10,2785	-45,1400	11,0985	-39,5315	11,9185	123,6701
10,2985	-66,2903	11,1185	-34,5880	11,9385	108,4431
10,3185	-100,8835	11,1385	-12,1076	11,9585	122,9650
10,3385	-154,9533	11,1585	-12,5855	11,9785	81,1219
10,3585	-147,4280	11,1785	-20,0055	11,9985	26,2856
10,3785	-95,3362	11,1985	-11,2822	12,0185	25,8989
10,3985	-141,0141	11,2185	-3,9594	12,0385	-1,9056
10,4185	-138,7995	11,2385	-17,4616	12,0585	-22,7091
10,4385	-156,0172	11,2585	-26,7797	12,0785	15,8930
10,4585	-148,8380	11,2785	7,5774	12,0985	-17,9666
10,4785	-103,3353	11,2985	16,3190	12,1185	19,9576
10,4985	-108,1983	11,3185	4,3176	12,1385	1,9161
10,5185	-131,3988	11,3385	16,2014	12,1585	-0,0877
10,5385	-86,4741	11,3585	21,7773	12,1785	-34,5188
10,5585	-91,4105	11,3785	-0,8455	12,1985	20,6734
10,5785	-97,8888	11,3985	-10,6535	12,2185	-14,9812
10,5985	-83,4276	11,4185	5,7160	12,2385	27,8450
10,6185	-55,1100	11,4385	-6,9449	12,2585	-14,0275
10,6385	-16,1263	11,4585	-19,9211	12,2785	32,9095
10,6585	-17,4095	11,4785	7,3311	12,2985	-7,4293
10,6785	-12,1708	11,4985	-31,7041	12,3185	36,5380
10,6985	0,3320	11,5185	-14,5598	12,3385	38,8816
10,7185	-12,2628	11,5385	-11,7606	12,3585	7,1357
10,7385	-7,1763	11,5585	-35,3854	12,3785	25,5591
10,7585	-11,8057	11,5785	-8,1343	12,3985	24,9948
10,7785	-33,4369	11,5985	28,4428	12,4185	2,5069
10,7985	-68,4902	11,6185	32,1031	12,4385	-3,6603

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
12,4585	2,7795	13,3585	-0,3973	14,2585	220,8605
12,4785	-25,0945	13,3785	-9,2185	14,2785	230,3986
12,4985	-0,4843	13,3985	-11,4733	14,2985	288,0811
12,5185	-0,2096	13,4185	1,7379	14,3185	391,1059
12,5385	-4,0890	13,4385	-8,1540	14,3385	530,8388
12,5585	-9,9028	13,4585	15,5803	14,3585	734,6366
12,5785	-18,0955	13,4785	32,7767	14,3785	952,8566
12,5985	-18,3313	13,4985	-0,0447	14,3985	1361,3750
12,6185	-6,2695	13,5185	-25,3157	14,4185	1765,8940
12,6385	-9,7254	13,5385	-26,4322	14,4385	2240,0640
12,6585	12,9708	13,5585	3,5496	14,4585	2524,1300
12,6785	7,7871	13,5785	20,8862	14,4785	2500,5120
12,6985	-0,2903	13,5985	19,0421	14,4985	2110,8330
12,7185	-2,5548	13,6185	29,7801	14,5185	1611,7340
12,7385	-28,6232	13,6385	22,5925	14,5385	1091,0060
12,7585	-15,5315	13,6585	14,6162	14,5585	747,5551
12,7785	3,1649	13,6785	39,4919	14,5785	490,3857
12,7985	6,3320	13,6985	47,9754	14,5985	363,1787
12,8185	2,2214	13,7185	43,8533	14,6185	279,9329
12,8385	-4,1989	13,7385	50,6713	14,6385	229,3622
12,8585	7,5783	13,7585	63,8606	14,6585	177,3101
12,8785	6,2391	13,7785	113,0466	14,6785	172,4709
12,8985	12,0215	13,7985	125,5530	14,6985	102,8483
12,9185	10,4782	13,8185	212,6130	14,7185	110,9667
12,9385	1,5926	13,8385	342,0395	14,7385	68,0506
12,9585	3,5132	13,8585	404,7697	14,7585	81,6935
12,9785	-1,6079	13,8785	553,8157	14,7785	60,5548
12,9985	-7,8585	13,8985	529,9938	14,7985	58,3850
13,0185	13,2854	13,9185	477,5260	14,8185	58,2574
13,0385	17,3377	13,9385	384,8841	14,8385	54,5474
13,0585	-9,0966	13,9585	275,3802	14,8585	28,3339
13,0785	1,9939	13,9785	211,5504	14,8785	27,7728
13,0985	16,2194	13,9985	124,3859	14,8985	53,1235
13,1185	7,1646	14,0185	79,8205	14,9185	53,3316
13,1385	8,4569	14,0385	88,1010	14,9385	46,3953
13,1585	3,1470	14,0585	102,8826	14,9585	41,0041
13,1785	13,7399	14,0785	128,9651	14,9785	15,2911
13,1985	7,6852	14,0985	115,1850	14,9985	-2,5805
13,2185	-21,4001	14,1185	105,4880	15,0185	4,6953
13,2385	-23,9798	14,1385	103,9722	15,0385	16,4691
13,2585	-14,4850	14,1585	120,4502	15,0585	12,4868
13,2785	-5,9177	14,1785	125,3934	15,0785	18,9942
13,2985	-6,5448	14,1985	139,1178	15,0985	-2,3538
13,3185	-1,0090	14,2185	135,2969	15,1185	-9,7198
13,3385	-5,4949	14,2385	158,9925	15,1385	-18,2090

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
15,1585	-15,5721	16,0585	163,7280	16,9585	195,9633
15,1785	15,5678	16,0785	204,9424	16,9785	271,7389
15,1985	14,4500	16,0985	255,3901	16,9985	239,3067
15,2185	7,5175	16,1185	283,7765	17,0185	213,5388
15,2385	-8,8467	16,1385	301,0307	17,0385	165,4817
15,2585	-38,3578	16,1585	253,4114	17,0585	99,9082
15,2785	-16,9802	16,1785	238,1187	17,0785	48,3671
15,2985	17,2328	16,1985	166,8333	17,0985	46,6577
15,3185	7,4262	16,2185	129,0360	17,1185	30,7542
15,3385	-16,5627	16,2385	80,9623	17,1385	-4,7368
15,3585	-11,8467	16,2585	41,5891	17,1585	-16,4982
15,3785	-1,4786	16,2785	44,3125	17,1785	0,3601
15,3985	-5,3789	16,2985	10,0151	17,1985	15,2131
15,4185	0,2022	16,3185	9,4580	17,2185	15,7634
15,4385	0,9895	16,3385	-24,5724	17,2385	4,2184
15,4585	0,1731	16,3585	-1,3044	17,2585	20,4737
15,4785	-11,8105	16,3785	9,3668	17,2785	53,5415
15,4985	-0,1410	16,3985	28,3317	17,2985	59,6143
15,5185	17,0816	16,4185	-13,9089	17,3185	61,8442
15,5385	0,0202	16,4385	-9,3974	17,3385	75,9307
15,5585	-16,6032	16,4585	-36,3407	17,3585	80,0813
15,5785	-11,2970	16,4785	20,6067	17,3785	68,4347
15,5985	16,3285	16,4985	-26,3143	17,3985	67,6876
15,6185	4,4716	16,5185	-20,4410	17,4185	86,9793
15,6385	-8,2525	16,5385	-21,4769	17,4385	126,6271
15,6585	6,0069	16,5585	-36,2926	17,4585	157,7006
15,6785	0,2190	16,5785	-47,5076	17,4785	184,2807
15,6985	4,0143	16,5985	-43,3248	17,4985	184,9268
15,7185	1,6921	16,6185	-38,6757	17,5185	153,0390
15,7385	-1,0149	16,6385	-28,3671	17,5385	141,9901
15,7585	26,0103	16,6585	-21,2232	17,5585	89,3219
15,7785	4,0645	16,6785	-4,9557	17,5785	44,5262
15,7985	9,2929	16,6985	-2,1582	17,5985	10,0285
15,8185	2,2806	16,7185	11,7664	17,6185	7,7201
15,8385	-19,1617	16,7385	39,3187	17,6385	-3,2519
15,8585	4,3749	16,7585	31,0943	17,6585	4,3637
15,8785	4,7483	16,7785	48,2910	17,6785	-5,1039
15,8985	50,6992	16,7985	114,5077	17,6985	5,5989
15,9185	41,9956	16,8185	168,7433	17,7185	22,5594
15,9385	32,5891	16,8385	199,3706	17,7385	25,3213
15,9585	53,9978	16,8585	175,1905	17,7585	9,1686
15,9785	43,7579	16,8785	136,9770	17,7785	-19,8017
15,9985	67,4864	16,8985	121,9610	17,7985	-5,9342
16,0185	82,2050	16,9185	136,7343	17,8185	2,4069
16,0385	67,9065	16,9385	122,2049	17,8385	7,2626

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
17,8585	34,2336	18,7585	182,9451	19,6585	-32,3815
17,8785	26,8467	18,7785	169,2451	19,6785	-33,4716
17,8985	2,4240	18,7985	154,4678	19,6985	-34,1482
17,9185	54,1522	18,8185	113,8783	19,7185	-34,1137
17,9385	71,7285	18,8385	84,8725	19,7385	-12,9240
17,9585	96,8515	18,8585	30,2861	19,7585	-5,2411
17,9785	134,5846	18,8785	19,1137	19,7785	-22,0379
17,9985	159,6163	18,8985	24,3801	19,7985	1,0960
18,0185	253,5962	18,9185	44,0005	19,8185	15,9691
18,0385	395,6083	18,9385	23,7186	19,8385	2,1769
18,0585	558,8439	18,9585	14,1795	19,8585	-11,2386
18,0785	804,0095	18,9785	72,1199	19,8785	-8,3969
18,0985	1084,6740	18,9985	83,9313	19,8985	-15,1435
18,1185	1289,2230	19,0185	102,6493	19,9185	6,2110
18,1385	1547,6890	19,0385	107,8554	19,9385	16,1576
18,1585	1531,4530	19,0585	100,5235	19,9585	15,0405
18,1785	1330,5830	19,0785	95,3932	19,9785	25,6967
18,1985	1066,7370	19,0985	69,9676	19,9985	27,2930
18,2185	754,4419	19,1185	32,0431	20,0185	43,6372
18,2385	525,7098	19,1385	16,1808	20,0385	31,5739
18,2585	390,8094	19,1585	24,1469	20,0585	36,7223
18,2785	283,6862	19,1785	42,1126	20,0785	49,2822
18,2985	261,2928	19,1985	48,5937	20,0985	45,4899
18,3185	157,2239	19,2185	58,5696	20,1185	12,3233
18,3385	141,3847	19,2385	118,0581	20,1385	24,7297
18,3585	94,2384	19,2585	164,7026	20,1585	64,1881
18,3785	64,7514	19,2785	208,8793	20,1785	81,4257
18,3985	46,7950	19,2985	269,0089	20,1985	104,5175
18,4185	-5,6685	19,3185	333,3635	20,2185	139,6048
18,4385	-3,9510	19,3385	375,4011	20,2385	187,0947
18,4585	3,8801	19,3585	357,6825	20,2585	250,8174
18,4785	-27,7169	19,3785	289,7148	20,2785	366,7346
18,4985	-0,1760	19,3985	233,8252	20,2985	510,8016
18,5185	14,4595	19,4185	190,5439	20,3185	661,5595
18,5385	-25,0790	19,4385	142,0229	20,3385	887,2040
18,5585	15,8614	19,4585	107,7311	20,3585	974,0105
18,5785	-7,3463	19,4785	87,7562	20,3785	978,6502
18,5985	0,3294	19,4985	69,3278	20,3985	868,7261
18,6185	4,0338	19,5185	38,4999	20,4185	846,4390
18,6385	46,2025	19,5385	16,5726	20,4385	563,4256
18,6585	77,7935	19,5585	-4,2824	20,4585	530,9760
18,6785	97,1359	19,5785	-25,3257	20,4785	400,7683
18,6985	96,0180	19,5985	-15,9174	20,4985	343,1307
18,7185	150,0187	19,6185	-9,7692	20,5185	323,0612
18,7385	184,7751	19,6385	-17,2421	20,5385	365,0068

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
20,5585	414,2361	21,4585	25,8192	22,3585	113,7284
20,5785	478,8901	21,4785	39,7119	22,3785	95,4074
20,5985	580,4410	21,4985	34,9354	22,3985	66,5600
20,6185	597,8465	21,5185	42,0699	22,4185	50,5134
20,6385	708,1394	21,5385	73,7465	22,4385	69,2361
20,6585	642,6533	21,5585	118,8987	22,4585	52,4352
20,6785	638,7326	21,5785	130,2926	22,4785	1,8743
20,6985	493,0641	21,5985	116,1772	22,4985	-0,9715
20,7185	450,4751	21,6185	76,0619	22,5185	32,2117
20,7385	452,3731	21,6385	51,4476	22,5385	16,6594
20,7585	639,5638	21,6585	70,9261	22,5585	66,1620
20,7785	927,5967	21,6785	67,3190	22,5785	80,7571
20,7985	1355,8430	21,6985	39,6113	22,5985	81,7040
20,8185	1844,0180	21,7185	37,5833	22,6185	100,5910
20,8385	2277,6990	21,7385	61,4141	22,6385	136,2890
20,8585	2097,7810	21,7585	56,0798	22,6585	84,0613
20,8785	1532,7620	21,7785	38,8094	22,6785	77,1138
20,8985	1129,6520	21,7985	57,0491	22,6985	84,6048
20,9185	660,4916	21,8185	99,0836	22,7185	76,5191
20,9385	312,7828	21,8385	143,2438	22,7385	63,8764
20,9585	146,1142	21,8585	189,3218	22,7585	-23,2274
20,9785	102,4092	21,8785	182,2793	22,7785	-20,5839
20,9985	61,6851	21,8985	235,3448	22,7985	-8,7584
21,0185	116,2707	21,9185	268,6527	22,8185	-2,2419
21,0385	90,1016	21,9385	280,8965	22,8385	24,2991
21,0585	76,1061	21,9585	369,9382	22,8585	7,2124
21,0785	34,4206	21,9785	439,3605	22,8785	11,5690
21,0985	35,6294	21,9985	506,5807	22,8985	21,2503
21,1185	37,1852	22,0185	660,0033	22,9185	28,7003
21,1385	50,9523	22,0385	819,1371	22,9385	42,4124
21,1585	21,7307	22,0585	1018,2200	22,9585	36,5251
21,1785	33,2517	22,0785	1172,3790	22,9785	99,2043
21,1985	18,5854	22,0985	1338,6280	22,9985	110,5594
21,2185	8,7879	22,1185	1357,3800	23,0185	123,7200
21,2385	-10,9367	22,1385	1284,4970	23,0385	156,5918
21,2585	-16,9163	22,1585	1078,2580	23,0585	175,1703
21,2785	-22,1629	22,1785	907,1424	23,0785	179,8328
21,2985	-9,7556	22,1985	748,9887	23,0985	135,0202
21,3185	-0,0629	22,2185	566,7723	23,1185	132,7806
21,3385	-4,9749	22,2385	457,3674	23,1385	99,7643
21,3585	6,3176	22,2585	330,4135	23,1585	81,6350
21,3785	-5,3474	22,2785	223,8931	23,1785	46,7526
21,3985	-0,3208	22,2985	179,6188	23,1985	30,3602
21,4185	19,8848	22,3185	144,0727	23,2185	30,8408
21,4385	8,3921	22,3385	119,3850	23,2385	5,8847

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
23,2585	12,1286	24,1585	240,9616	25,0585	203,2246
23,2785	15,8593	24,1785	200,2346	25,0785	152,0856
23,2985	-6,8568	24,1985	216,0075	25,0985	83,7222
23,3185	-12,3767	24,2185	188,8930	25,1185	69,9202
23,3385	9,5146	24,2385	186,5617	25,1385	50,1093
23,3585	3,8284	24,2585	146,6614	25,1585	64,1151
23,3785	-9,5847	24,2785	121,0759	25,1785	45,2185
23,3985	9,7197	24,2985	88,6932	25,1985	30,0673
23,4185	-3,0141	24,3185	31,6335	25,2185	14,7329
23,4385	5,5905	24,3385	58,0239	25,2385	-27,3956
23,4585	2,0866	24,3585	29,7511	25,2585	6,5365
23,4785	1,5997	24,3785	13,0742	25,2785	23,1179
23,4985	17,0447	24,3985	20,6385	25,2985	-27,9069
23,5185	30,1420	24,4185	39,2429	25,3185	-16,3217
23,5385	46,1210	24,4385	27,4350	25,3385	-15,3629
23,5585	71,6648	24,4585	-9,8846	25,3585	-12,7022
23,5785	80,6410	24,4785	-2,4703	25,3785	-10,4990
23,5985	99,3258	24,4985	2,8116	25,3985	1,1000
23,6185	123,1086	24,5185	19,1226	25,4185	5,1344
23,6385	155,0391	24,5385	27,4734	25,4385	26,1118
23,6585	205,4922	24,5585	-1,5517	25,4585	51,5347
23,6785	264,7125	24,5785	-8,9267	25,4785	64,4743
23,6985	329,4161	24,5985	-20,3861	25,4985	64,7408
23,7185	431,9351	24,6185	10,8699	25,5185	46,0142
23,7385	532,4636	24,6385	32,3828	25,5385	44,2298
23,7585	607,0787	24,6585	47,8840	25,5585	54,3136
23,7785	732,3201	24,6785	49,8094	25,5785	50,5584
23,7985	819,6061	24,6985	52,9431	25,5985	14,2156
23,8185	833,3963	24,7185	80,8267	25,6185	0,0040
23,8385	822,6759	24,7385	125,4493	25,6385	18,0560
23,8585	781,8738	24,7585	173,1503	25,6585	19,1059
23,8785	730,2414	24,7785	244,9950	25,6785	-0,7512
23,8985	694,3660	24,7985	218,7699	25,6985	-17,0878
23,9185	718,2786	24,8185	360,9303	25,7185	5,7050
23,9385	849,8551	24,8385	455,2766	25,7385	24,9519
23,9585	925,0655	24,8585	505,5520	25,7585	24,5055
23,9785	1059,8280	24,8785	650,9069	25,7785	62,4571
23,9985	1072,8310	24,8985	743,3687	25,7985	57,7272
24,0185	952,7643	24,9185	743,3384	25,8185	61,7981
24,0385	803,8442	24,9385	713,0625	25,8385	133,0937
24,0585	635,8610	24,9585	654,1529	25,8585	183,6025
24,0785	486,4432	24,9785	583,0778	25,8785	222,6492
24,0985	408,7923	24,9985	558,5014	25,8985	256,5209
24,1185	298,6726	25,0185	439,1218	25,9185	310,0930
24,1385	263,7709	25,0385	325,6046	25,9385	364,1820

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
25,9585	382,3653	26,8585	382,7025	27,7585	39,1976
25,9785	363,1069	26,8785	415,4334	27,7785	21,4800
25,9985	366,5285	26,8985	402,6631	27,7985	37,8623
26,0185	340,9920	26,9185	445,5846	27,8185	9,9310
26,0385	297,8785	26,9385	439,9992	27,8385	-4,6067
26,0585	268,3586	26,9585	447,6942	27,8585	28,9506
26,0785	215,9505	26,9785	383,4537	27,8785	62,6608
26,0985	203,7323	26,9985	345,8241	27,8985	81,8080
26,1185	205,6783	27,0185	369,4554	27,9185	83,3983
26,1385	168,8520	27,0385	385,5630	27,9385	74,3428
26,1585	140,9921	27,0585	367,3779	27,9585	107,4795
26,1785	145,6730	27,0785	399,5522	27,9785	142,8761
26,1985	141,3605	27,0985	386,0886	27,9985	147,4431
26,2185	105,6067	27,1185	324,0444	28,0185	120,1575
26,2385	112,3931	27,1385	321,2790	28,0385	104,0459
26,2585	150,2616	27,1585	264,7833	28,0585	107,1961
26,2785	149,2607	27,1785	221,7638	28,0785	66,6666
26,2985	126,9774	27,1985	217,2695	28,0985	53,1699
26,3185	156,1541	27,2185	161,8878	28,1185	31,4552
26,3385	123,7351	27,2385	161,8123	28,1385	28,1991
26,3585	107,6380	27,2585	132,6985	28,1585	6,5325
26,3785	124,8279	27,2785	173,5173	28,1785	0,9935
26,3985	151,6592	27,2985	169,7546	28,1985	2,0923
26,4185	153,5251	27,3185	156,5105	28,2185	-1,8932
26,4385	189,7975	27,3385	148,6225	28,2385	23,1715
26,4585	293,1023	27,3585	150,2398	28,2585	21,5951
26,4785	447,8648	27,3785	187,8608	28,2785	52,2664
26,4985	688,3698	27,3985	272,4013	28,2985	85,0956
26,5185	1131,2760	27,4185	355,9966	28,3185	96,7723
26,5385	1821,4620	27,4385	455,6655	28,3385	80,8870
26,5585	3053,5610	27,4585	433,4202	28,3585	90,6996
26,5785	5312,0350	27,4785	490,8345	28,3785	80,7563
26,5985	8542,0550	27,4985	560,2872	28,3985	71,4628
26,6185	11828,4700	27,5185	607,3964	28,4185	75,7067
26,6385	12577,5500	27,5385	599,3417	28,4385	100,8066
26,6585	8418,7450	27,5585	540,6385	28,4585	100,6864
26,6785	6390,5690	27,5785	509,1809	28,4785	107,5698
26,6985	6257,1860	27,5985	408,3401	28,4985	115,5011
26,7185	3931,6760	27,6185	311,0146	28,5185	65,2111
26,7385	1595,5560	27,6385	257,8689	28,5385	58,2186
26,7585	725,4150	27,6585	242,4535	28,5585	58,2882
26,7785	548,6683	27,6785	190,2561	28,5785	67,5502
26,7985	416,3342	27,6985	168,0582	28,5985	31,9562
26,8185	389,3054	27,7185	125,8393	28,6185	27,6433
26,8385	339,6250	27,7385	90,9911	28,6385	26,9394

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
28,6585	100,7218	29,5585	492,1841	30,4585	-16,0163
28,6785	96,9516	29,5785	461,9664	30,4785	-30,8302
28,6985	81,0298	29,5985	498,5283	30,4985	3,0305
28,7185	84,2533	29,6185	548,6681	30,5185	7,4604
28,7385	53,8177	29,6385	579,0372	30,5385	24,9815
28,7585	55,7785	29,6585	533,1299	30,5585	10,8361
28,7785	55,8624	29,6785	476,5818	30,5785	19,0795
28,7985	53,0117	29,6985	427,2485	30,5985	10,5662
28,8185	34,4263	29,7185	365,6263	30,6185	28,6525
28,8385	35,5902	29,7385	290,5501	30,6385	46,8626
28,8585	12,1363	29,7585	210,2114	30,6585	78,5449
28,8785	-7,1898	29,7785	139,8071	30,6785	129,9196
28,8985	-6,7432	29,7985	116,8833	30,6985	148,1145
28,9185	23,1428	29,8185	85,0082	30,7185	152,9487
28,9385	53,9783	29,8385	36,1040	30,7385	204,3948
28,9585	80,9793	29,8585	15,7197	30,7585	168,9885
28,9785	83,6028	29,8785	27,8648	30,7785	183,9499
28,9985	109,8097	29,8985	35,3727	30,7985	167,6732
29,0185	118,6111	29,9185	18,9225	30,8185	118,8433
29,0385	145,5816	29,9385	10,4127	30,8385	83,0091
29,0585	189,3312	29,9585	6,1020	30,8585	80,9906
29,0785	223,8737	29,9785	-1,9504	30,8785	69,4030
29,0985	218,5276	29,9985	16,2226	30,8985	42,8649
29,1185	259,4077	30,0185	25,3416	30,9185	55,1311
29,1385	260,5125	30,0385	15,7830	30,9385	5,0332
29,1585	222,1747	30,0585	19,9044	30,9585	2,2354
29,1785	292,6598	30,0785	31,8191	30,9785	17,1620
29,1985	343,3385	30,0985	43,0949	30,9985	5,8303
29,2185	421,6606	30,1185	28,2072	31,0185	-15,2128
29,2385	531,1867	30,1385	16,3656	31,0385	-11,5427
29,2585	617,7407	30,1585	11,4119	31,0585	-16,6142
29,2785	701,5168	30,1785	9,9352	31,0785	-25,7245
29,2985	848,9458	30,1985	19,0357	31,0985	-14,6632
29,3185	1112,0880	30,2185	24,8449	31,1185	-56,3501
29,3385	1197,3950	30,2385	24,0235	31,1385	-15,3415
29,3585	1381,6240	30,2585	-15,3380	31,1585	-1,7667
29,3785	1557,0580	30,2785	7,3968	31,1785	4,3703
29,3985	1465,3610	30,2985	29,8908	31,1985	-24,6835
29,4185	1276,9450	30,3185	26,8954	31,2185	34,7344
29,4385	1144,6850	30,3385	23,7534	31,2385	9,7541
29,4585	964,1088	30,3585	1,3747	31,2585	58,0853
29,4785	809,1617	30,3785	21,9498	31,2785	58,4506
29,4985	687,6612	30,3985	-4,1430	31,2985	91,1563
29,5185	559,7271	30,4185	-35,1060	31,3185	97,8058
29,5385	514,4933	30,4385	-22,7611	31,3385	130,9302

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
31,3585	161,7315	32,2585	-30,9745	33,1585	-20,8234
31,3785	198,7055	32,2785	-33,9312	33,1785	-33,8517
31,3985	205,1160	32,2985	-19,8127	33,1985	-13,4656
31,4185	240,5246	32,3185	-38,5823	33,2185	-33,1537
31,4385	265,4174	32,3385	-36,2306	33,2385	-38,2928
31,4585	281,2940	32,3585	-9,3660	33,2585	-35,2289
31,4785	321,6026	32,3785	12,0631	33,2785	-28,9369
31,4985	323,4801	32,3985	3,2529	33,2985	-59,0979
31,5185	354,9173	32,4185	-15,7421	33,3185	-41,4771
31,5385	419,6176	32,4385	12,3639	33,3385	-24,5101
31,5585	403,0119	32,4585	29,2169	33,3585	-29,3796
31,5785	382,9302	32,4785	37,9910	33,3785	18,3905
31,5985	361,5949	32,4985	36,2966	33,3985	23,2058
31,6185	334,5159	32,5185	64,3457	33,4185	63,6572
31,6385	307,8832	32,5385	43,4440	33,4385	55,6395
31,6585	227,0564	32,5585	32,7109	33,4585	37,4351
31,6785	204,9957	32,5785	15,3350	33,4785	34,1688
31,6985	151,4055	32,5985	7,1510	33,4985	88,6288
31,7185	87,9219	32,6185	24,2533	33,5185	59,7874
31,7385	60,1826	32,6385	8,8697	33,5385	116,1812
31,7585	39,2179	32,6585	-19,3076	33,5585	161,6635
31,7785	13,9651	32,6785	-30,4627	33,5785	193,1837
31,7985	18,0886	32,6985	-27,5801	33,5985	207,2386
31,8185	19,2550	32,7185	-43,1652	33,6185	205,9113
31,8385	-24,2049	32,7385	-31,6618	33,6385	216,6787
31,8585	-36,2347	32,7585	-16,4951	33,6585	257,3579
31,8785	-10,5878	32,7785	-34,8015	33,6785	224,2528
31,8985	-20,3962	32,7985	-48,2146	33,6985	196,3261
31,9185	-21,3384	32,8185	-21,8454	33,7185	194,0063
31,9385	-33,4248	32,8385	-11,1224	33,7385	155,6304
31,9585	-38,9744	32,8585	60,4159	33,7585	141,7571
31,9785	-45,1624	32,8785	41,6374	33,7785	138,9958
31,9985	-38,9019	32,8985	31,4767	33,7985	133,0283
32,0185	-23,9874	32,9185	91,5706	33,8185	139,5747
32,0385	-32,2678	32,9385	75,0021	33,8385	138,4533
32,0585	-39,9360	32,9585	91,2226	33,8585	134,7762
32,0785	-39,6242	32,9785	119,0497	33,8785	146,4745
32,0985	-31,5156	32,9985	103,9360	33,8985	183,9825
32,1185	-23,6798	33,0185	113,3257	33,9185	139,3853
32,1385	-6,5014	33,0385	123,8500	33,9385	117,7621
32,1585	-10,0861	33,0585	51,2152	33,9585	114,7817
32,1785	-35,3130	33,0785	87,2224	33,9785	120,1827
32,1985	-22,4165	33,0985	29,3765	33,9985	88,9273
32,2185	-14,4323	33,1185	8,0650	34,0185	41,2108
32,2385	-22,6903	33,1385	27,4318	34,0385	44,1539

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
34,0585	52,2329	34,9585	-22,9287	35,8585	59,6715
34,0785	30,5332	34,9785	-37,3891	35,8785	54,9424
34,0985	6,6581	34,9985	-11,8822	35,8985	50,6715
34,1185	11,1553	35,0185	9,4140	35,9185	121,4076
34,1385	3,3706	35,0385	5,1852	35,9385	147,9737
34,1585	17,5643	35,0585	-8,4265	35,9585	189,9289
34,1785	34,5655	35,0785	24,6855	35,9785	190,9941
34,1985	21,3207	35,0985	26,1501	35,9985	171,1163
34,2185	22,6382	35,1185	60,1027	36,0185	189,6587
34,2385	23,4421	35,1385	4,2631	36,0385	192,6001
34,2585	38,8103	35,1585	-11,9987	36,0585	173,1313
34,2785	57,0510	35,1785	23,4211	36,0785	194,1509
34,2985	102,1746	35,1985	40,5298	36,0985	210,9314
34,3185	152,7940	35,2185	-12,8161	36,1185	210,4203
34,3385	156,1113	35,2385	18,9239	36,1385	210,7326
34,3585	192,5515	35,2585	2,4603	36,1585	206,9299
34,3785	226,2872	35,2785	-17,1701	36,1785	216,5043
34,3985	232,5343	35,2985	-18,6390	36,1985	204,8743
34,4185	209,7186	35,3185	-41,5177	36,2185	173,3601
34,4385	179,9753	35,3385	-23,7803	36,2385	144,3015
34,4585	172,4102	35,3585	-78,6108	36,2585	139,7786
34,4785	137,4921	35,3785	-39,9511	36,2785	140,9740
34,4985	115,3532	35,3985	-78,5688	36,2985	126,1793
34,5185	117,5672	35,4185	-69,7932	36,3185	85,1933
34,5385	61,4497	35,4385	-62,9885	36,3385	70,9475
34,5585	11,9156	35,4585	-68,5308	36,3585	89,5354
34,5785	20,4764	35,4785	-63,1358	36,3785	56,8756
34,5985	-19,0163	35,4985	-35,3983	36,3985	52,4574
34,6185	-20,5210	35,5185	-61,2292	36,4185	93,6072
34,6385	-50,6163	35,5385	-67,8422	36,4385	123,6807
34,6585	-26,9181	35,5585	-87,4064	36,4585	192,6505
34,6785	-27,5110	35,5785	-77,0126	36,4785	337,7066
34,6985	-10,6944	35,5985	-80,5737	36,4985	487,3739
34,7185	-36,7522	35,6185	-85,2106	36,5185	665,0916
34,7385	-18,2985	35,6385	-75,5056	36,5385	777,3159
34,7585	-25,1507	35,6585	-48,4008	36,5585	620,2828
34,7785	-26,7305	35,6785	-69,9917	36,5785	389,8777
34,7985	-2,1794	35,6985	-60,0161	36,5985	363,6723
34,8185	5,0237	35,7185	-81,4583	36,6185	389,5287
34,8385	9,6764	35,7385	-91,2699	36,6385	268,8589
34,8585	8,5909	35,7585	-62,6347	36,6585	192,5799
34,8785	-31,2167	35,7785	-33,5085	36,6785	79,3019
34,8985	-39,6570	35,7985	-6,2586	36,6985	19,3626
34,9185	-15,0414	35,8185	2,1179	36,7185	-35,5717
34,9385	-28,2683	35,8385	13,8232	36,7385	-28,7634

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
36,7585	-32,7430	37,6585	35,6528	38,5585	-7,1093
36,7785	-30,7454	37,6785	17,7843	38,5785	-21,4972
36,7985	13,5670	37,6985	50,1330	38,5985	-9,6905
36,8185	-0,3531	37,7185	80,6892	38,6185	0,0199
36,8385	14,7106	37,7385	66,4170	38,6385	5,2732
36,8585	20,2950	37,7585	79,6045	38,6585	5,2878
36,8785	53,7053	37,7785	107,4828	38,6785	5,0254
36,8985	64,4730	37,7985	106,8216	38,6985	-1,2576
36,9185	124,6030	37,8185	114,4212	38,7185	-6,2610
36,9385	132,9938	37,8385	106,6279	38,7385	-13,5972
36,9585	161,1773	37,8585	90,8875	38,7585	1,4012
36,9785	184,3511	37,8785	68,2126	38,7785	-4,7212
36,9985	235,3844	37,8985	81,6328	38,7985	-9,0326
37,0185	325,2233	37,9185	76,1110	38,8185	-11,4384
37,0385	356,6249	37,9385	76,9924	38,8385	-13,5019
37,0585	375,1605	37,9585	59,1919	38,8585	-7,9612
37,0785	377,3796	37,9785	38,4253	38,8785	-7,3904
37,0985	403,0965	37,9985	16,5403	38,8985	-21,2322
37,1185	389,8950	38,0185	17,4150	38,9185	-24,0013
37,1385	361,0982	38,0385	7,2518	38,9385	-44,9565
37,1585	323,2881	38,0585	15,9721	38,9585	-9,7129
37,1785	270,0243	38,0785	21,4901	38,9785	19,3119
37,1985	261,8179	38,0985	47,9729	38,9985	0,8075
37,2185	181,8906	38,1185	28,5918	39,0185	37,2394
37,2385	116,2954	38,1385	-0,1376	39,0385	47,5660
37,2585	81,6062	38,1585	0,3783	39,0585	3,1614
37,2785	62,2158	38,1785	-7,8032	39,0785	16,7155
37,2985	44,6279	38,1985	-6,7582	39,0985	63,6393
37,3185	83,8973	38,2185	27,5763	39,1185	73,0221
37,3385	94,4971	38,2385	37,7079	39,1385	105,7475
37,3585	74,6243	38,2585	27,1053	39,1585	67,2309
37,3785	56,3805	38,2785	13,3688	39,1785	44,5735
37,3985	56,6558	38,2985	13,5079	39,1985	146,5110
37,4185	57,3507	38,3185	11,7719	39,2185	191,0554
37,4385	45,7613	38,3385	9,4291	39,2385	129,7014
37,4585	49,4000	38,3585	15,2167	39,2585	137,0439
37,4785	20,8087	38,3785	18,1791	39,2785	159,6753
37,4985	44,7868	38,3985	20,2125	39,2985	249,2686
37,5185	6,1080	38,4185	35,7693	39,3185	280,1927
37,5385	54,4849	38,4385	35,4002	39,3385	362,0876
37,5585	67,4299	38,4585	17,6620	39,3585	379,4298
37,5785	27,6309	38,4785	19,8826	39,3785	459,4680
37,5985	-13,0184	38,4985	4,5430	39,3985	554,5318
37,6185	21,7504	38,5185	9,7298	39,4185	628,1142
37,6385	20,4968	38,5385	23,7108	39,4385	828,9254

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
39,4585	986,4662	40,3585	175,8740	41,2585	43,2554
39,4785	645,8016	40,3785	169,7292	41,2785	10,6064
39,4985	666,2302	40,3985	134,5745	41,2985	-7,5469
39,5185	616,6263	40,4185	75,9385	41,3185	20,3336
39,5385	627,2362	40,4385	46,6339	41,3385	-9,6428
39,5585	800,9577	40,4585	33,0425	41,3585	1,5655
39,5785	591,7246	40,4785	23,3191	41,3785	55,6256
39,5985	471,4964	40,4985	25,4934	41,3985	27,1442
39,6185	446,5283	40,5185	18,4206	41,4185	31,2078
39,6385	433,9226	40,5385	14,4521	41,4385	19,1717
39,6585	405,6373	40,5585	50,6432	41,4585	25,6243
39,6785	337,1299	40,5785	64,7177	41,4785	-13,3126
39,6985	333,1428	40,5985	63,1174	41,4985	16,5517
39,7185	291,5186	40,6185	88,8376	41,5185	-18,1312
39,7385	276,6328	40,6385	66,4430	41,5385	-1,4367
39,7585	279,3563	40,6585	46,5617	41,5585	22,2183
39,7785	225,0087	40,6785	76,1375	41,5785	-5,8379
39,7985	217,7444	40,6985	52,0855	41,5985	-24,0852
39,8185	235,3301	40,7185	27,5558	41,6185	-29,6918
39,8385	188,5316	40,7385	50,0447	41,6385	-10,1114
39,8585	186,1766	40,7585	39,4755	41,6585	-12,8818
39,8785	201,9332	40,7785	57,6182	41,6785	21,9748
39,8985	223,0528	40,7985	71,5673	41,6985	-1,1982
39,9185	245,6853	40,8185	46,1111	41,7185	-5,3812
39,9385	215,3286	40,8385	40,1860	41,7385	-0,3135
39,9585	212,5283	40,8585	39,1941	41,7585	18,8305
39,9785	203,4298	40,8785	39,8347	41,7785	16,5321
39,9985	236,8593	40,8985	38,7529	41,7985	45,4585
40,0185	228,5675	40,9185	22,9675	41,8185	50,5807
40,0385	195,4786	40,9385	-9,5427	41,8385	12,2560
40,0585	185,8851	40,9585	-11,5554	41,8585	20,5132
40,0785	175,7005	40,9785	-19,1673	41,8785	25,7845
40,0985	199,3072	40,9985	-28,0862	41,8985	41,7798
40,1185	183,7151	41,0185	0,0937	41,9185	46,6277
40,1385	198,8701	41,0385	8,4457	41,9385	47,5819
40,1585	193,1815	41,0585	16,6775	41,9585	42,1528
40,1785	180,4643	41,0785	20,6123	41,9785	79,0292
40,1985	220,5572	41,0985	30,9335	41,9985	72,3684
40,2185	237,2773	41,1185	43,8592	42,0185	50,3532
40,2385	276,4784	41,1385	67,6874	42,0385	68,5836
40,2585	379,7291	41,1585	44,4106	42,0585	104,3756
40,2785	451,4414	41,1785	16,0825	42,0785	109,4298
40,2985	346,3225	41,1985	40,1859	42,0985	95,2483
40,3185	212,1079	41,2185	42,0296	42,1185	113,5490
40,3385	184,7319	41,2385	30,2939	42,1385	103,9952

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
42,1585	110,9635	43,0585	127,1047	43,9585	-13,1985
42,1785	103,2500	43,0785	131,7660	43,9785	-9,3213
42,1985	87,4683	43,0985	183,6851	43,9985	-27,8727
42,2185	107,2283	43,1185	195,7849	44,0185	-29,1542
42,2385	80,8258	43,1385	212,3685	44,0385	-33,0967
42,2585	98,4184	43,1585	183,5379	44,0585	-25,2526
42,2785	124,6915	43,1785	166,9667	44,0785	-30,4657
42,2985	133,5176	43,1985	174,7299	44,0985	-57,8959
42,3185	222,5475	43,2185	152,9989	44,1185	-31,9795
42,3385	224,3253	43,2385	144,5050	44,1385	-35,2518
42,3585	211,9608	43,2585	152,8695	44,1585	-43,0898
42,3785	248,0209	43,2785	127,5165	44,1785	-43,2240
42,3985	344,6721	43,2985	97,9225	44,1985	-26,6007
42,4185	402,6020	43,3185	118,2553	44,2185	-30,3717
42,4385	400,1430	43,3385	143,0488	44,2385	-29,7766
42,4585	354,8038	43,3585	107,2965	44,2585	-9,4402
42,4785	250,2793	43,3785	93,9578	44,2785	-2,0036
42,4985	208,5153	43,3985	155,3646	44,2985	7,5532
42,5185	244,0147	43,4185	193,9839	44,3185	0,2602
42,5385	272,9091	43,4385	109,1857	44,3385	-11,1423
42,5585	258,2576	43,4585	135,8625	44,3585	-33,3621
42,5785	221,2755	43,4785	152,4328	44,3785	-39,5267
42,5985	197,4365	43,4985	72,1092	44,3985	-6,6382
42,6185	163,4452	43,5185	117,8146	44,4185	-6,6791
42,6385	127,6170	43,5385	93,5705	44,4385	-4,8936
42,6585	125,8948	43,5585	78,8887	44,4585	25,6041
42,6785	141,5468	43,5785	68,6876	44,4785	-13,0425
42,6985	151,8530	43,5985	39,5585	44,4985	-19,1029
42,7185	142,1235	43,6185	44,9299	44,5185	-6,8070
42,7385	118,8418	43,6385	69,0310	44,5385	6,0939
42,7585	100,0882	43,6585	35,8878	44,5585	21,1473
42,7785	102,0873	43,6785	-7,1406	44,5785	26,5482
42,7985	129,1987	43,6985	-21,3993	44,5985	-5,5940
42,8185	126,0999	43,7185	0,4750	44,6185	-23,3619
42,8385	130,5048	43,7385	-36,1750	44,6385	-3,9780
42,8585	138,5921	43,7585	-65,0817	44,6585	3,2164
42,8785	142,2139	43,7785	-76,7658	44,6785	-2,8881
42,8985	139,0056	43,7985	-51,4900	44,6985	-1,6211
42,9185	101,7775	43,8185	-14,3951	44,7185	-1,8309
42,9385	87,9882	43,8385	-69,0559	44,7385	6,3269
42,9585	110,4419	43,8585	-42,2882	44,7585	20,5945
42,9785	122,1928	43,8785	-23,8079	44,7785	-4,7597
42,9985	115,7998	43,8985	-30,3508	44,7985	-25,0565
43,0185	140,3798	43,9185	-11,4217	44,8185	-8,3090
43,0385	139,0866	43,9385	-29,2235	44,8385	-9,7281

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
44,8585	-20,1724	45,7585	352,6377	46,6585	105,2047
44,8785	5,0586	45,7785	381,5426	46,6785	92,8735
44,8985	-0,9730	45,7985	365,4766	46,6985	81,1974
44,9185	-23,0207	45,8185	188,2418	46,7185	100,9749
44,9385	-16,7048	45,8385	113,6819	46,7385	121,4955
44,9585	-16,5047	45,8585	199,6979	46,7585	133,3686
44,9785	-2,6691	45,8785	171,7815	46,7785	134,6848
44,9985	16,0723	45,8985	187,2146	46,7985	118,2340
45,0185	39,4468	45,9185	177,4740	46,8185	111,9268
45,0385	10,5777	45,9385	86,7125	46,8385	126,6968
45,0585	4,3433	45,9585	46,2520	46,8585	116,1341
45,0785	38,7533	45,9785	28,9077	46,8785	103,0739
45,0985	43,3886	45,9985	21,4809	46,8985	117,9147
45,1185	52,3539	46,0185	12,5297	46,9185	115,9581
45,1385	42,8373	46,0385	25,3198	46,9385	117,4984
45,1585	62,7121	46,0585	-2,9171	46,9585	146,1897
45,1785	36,5226	46,0785	2,7169	46,9785	175,1943
45,1985	53,7739	46,0985	7,0929	46,9985	196,3565
45,2185	75,7874	46,1185	-8,3481	47,0185	190,5559
45,2385	52,4480	46,1385	9,5331	47,0385	200,4149
45,2585	57,8562	46,1585	-10,3209	47,0585	224,1493
45,2785	41,8654	46,1785	5,7568	47,0785	250,8912
45,2985	35,8004	46,1985	15,3487	47,0985	208,6961
45,3185	61,6990	46,2185	-6,1564	47,1185	228,9389
45,3385	34,0541	46,2385	-8,0088	47,1385	250,0214
45,3585	30,7690	46,2585	-5,2373	47,1585	258,2042
45,3785	49,2127	46,2785	8,0922	47,1785	269,0134
45,3985	52,1868	46,2985	2,2143	47,1985	251,0115
45,4185	32,9829	46,3185	25,3717	47,2185	245,6916
45,4385	47,6060	46,3385	3,6131	47,2385	259,4954
45,4585	27,1885	46,3585	-18,2970	47,2585	254,8261
45,4785	16,5884	46,3785	-9,8029	47,2785	229,6124
45,4985	76,0212	46,3985	-4,6681	47,2985	216,7211
45,5185	26,9135	46,4185	17,8515	47,3185	233,7558
45,5385	37,6278	46,4385	11,3140	47,3385	218,5196
45,5585	37,8127	46,4585	14,9775	47,3585	226,9068
45,5785	13,8759	46,4785	10,2607	47,3785	199,3041
45,5985	19,9073	46,4985	9,2159	47,3985	184,6592
45,6185	48,4213	46,5185	9,8697	47,4185	197,4583
45,6385	62,2189	46,5385	22,2556	47,4385	200,5817
45,6585	85,0934	46,5585	40,7017	47,4585	200,9035
45,6785	148,8998	46,5785	54,4541	47,4785	226,3165
45,6985	172,3268	46,5985	58,9300	47,4985	207,4157
45,7185	258,6647	46,6185	76,1939	47,5185	198,9335
45,7385	271,1220	46,6385	88,5972	47,5385	157,7678

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
47,5585	135,7721	48,4585	190,3022	49,3585	-3,8258
47,5785	160,4482	48,4785	215,6621	49,3785	-5,2188
47,5985	124,6888	48,4985	190,6472	49,3985	4,7880
47,6185	65,3000	48,5185	178,7797	49,4185	-6,3015
47,6385	116,4780	48,5385	185,5161	49,4385	-5,7583
47,6585	109,9871	48,5585	194,4369	49,4585	6,0110
47,6785	90,0080	48,5785	167,4520	49,4785	8,4426
47,6985	71,9557	48,5985	154,0394	49,4985	6,1212
47,7185	45,5572	48,6185	139,6986	49,5185	3,9885
47,7385	83,4446	48,6385	116,4317	49,5385	17,8103
47,7585	91,4370	48,6585	144,5879	49,5585	-4,5360
47,7785	111,9036	48,6785	125,2920	49,5785	13,3785
47,7985	132,9097	48,6985	82,2922	49,5985	44,9830
47,8185	74,8677	48,7185	52,7709	49,6185	50,6967
47,8385	85,6313	48,7385	63,6333	49,6385	40,0984
47,8585	106,2696	48,7585	73,7747	49,6585	50,0266
47,8785	134,7632	48,7785	54,1851	49,6785	43,3743
47,8985	98,4736	48,7985	58,9847	49,6985	70,4835
47,9185	109,5219	48,8185	76,2895	49,7185	80,3746
47,9385	101,4656	48,8385	66,0823	49,7385	73,9787
47,9585	82,0806	48,8585	65,0277	49,7585	24,8103
47,9785	115,1680	48,8785	63,7391	49,7785	11,6325
47,9985	87,1448	48,8985	62,3107	49,7985	38,0464
48,0185	83,5701	48,9185	82,2789	49,8185	27,3070
48,0385	93,2691	48,9385	85,5355	49,8385	45,4005
48,0585	84,4031	48,9585	68,0494	49,8585	21,6880
48,0785	115,6639	48,9785	47,2712	49,8785	18,8985
48,0985	148,7710	48,9985	33,8980	49,8985	8,7327
48,1185	106,1860	49,0185	54,0751	49,9185	22,0030
48,1385	118,3393	49,0385	57,8941	49,9385	44,1200
48,1585	101,2039	49,0585	47,1532	49,9585	20,7077
48,1785	111,6253	49,0785	70,0173	49,9785	72,6926
48,1985	73,0155	49,0985	57,7071	49,9985	167,1978
48,2185	91,0972	49,1185	73,6256	50,0185	238,6249
48,2385	97,7569	49,1385	76,0944	50,0385	405,1251
48,2585	93,9165	49,1585	70,1966	50,0585	685,9959
48,2785	121,9102	49,1785	64,8432	50,0785	969,8058
48,2985	139,7552	49,1985	39,0727	50,0985	1286,6200
48,3185	153,9439	49,2185	29,7780	50,1185	1291,7900
48,3385	142,1981	49,2385	43,6604	50,1385	1011,5870
48,3585	157,4820	49,2585	50,0041	50,1585	662,0615
48,3785	175,2154	49,2785	18,1986	50,1785	500,3995
48,3985	177,4243	49,2985	14,2601	50,1985	482,5315
48,4185	191,9912	49,3185	-0,8541	50,2185	607,2518
48,4385	163,5715	49,3385	6,2583	50,2385	722,0042

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
50,2585	651,3265	51,1585	6,6369	52,0585	-18,2888
50,2785	468,3755	51,1785	-2,7805	52,0785	-10,6281
50,2985	261,6761	51,1985	0,2374	52,0985	11,0685
50,3185	126,5210	51,2185	23,5007	52,1185	11,8704
50,3385	61,0923	51,2385	30,9386	52,1385	11,0621
50,3585	80,4744	51,2585	27,5979	52,1585	14,8688
50,3785	45,7772	51,2785	20,3085	52,1785	13,4350
50,3985	31,5595	51,2985	13,8578	52,1985	23,5900
50,4185	38,6962	51,3185	2,2182	52,2185	36,4554
50,4385	31,3826	51,3385	-9,1692	52,2385	18,6984
50,4585	30,9052	51,3585	-1,6366	52,2585	-6,3725
50,4785	42,3530	51,3785	7,6079	52,2785	9,5866
50,4985	28,0226	51,3985	-3,7518	52,2985	3,4058
50,5185	16,5166	51,4185	-2,9515	52,3185	10,9007
50,5385	17,0960	51,4385	6,9525	52,3385	20,1449
50,5585	17,5829	51,4585	-6,0647	52,3585	31,7422
50,5785	21,0788	51,4785	-5,4042	52,3785	21,1740
50,5985	11,9355	51,4985	5,9446	52,3985	28,7439
50,6185	-6,0013	51,5185	-25,0939	52,4185	52,2778
50,6385	-22,6088	51,5385	-22,1487	52,4385	13,5063
50,6585	-3,8384	51,5585	-21,3947	52,4585	17,6786
50,6785	-19,3504	51,5785	11,4570	52,4785	-3,0791
50,6985	-18,4349	51,5985	3,2846	52,4985	24,8935
50,7185	-18,1928	51,6185	-2,7040	52,5185	33,9582
50,7385	-14,6071	51,6385	-0,7362	52,5385	33,1104
50,7585	-6,9372	51,6585	-4,8979	52,5585	30,7037
50,7785	-8,7458	51,6785	-16,8342	52,5785	39,7990
50,7985	-24,1508	51,6985	-5,3276	52,5985	20,6008
50,8185	-16,8522	51,7185	3,9918	52,6185	20,3921
50,8385	-6,2884	51,7385	24,3521	52,6385	34,2268
50,8585	-12,0174	51,7585	-3,8465	52,6585	11,2864
50,8785	-6,0730	51,7785	1,3940	52,6785	32,4959
50,8985	-19,5303	51,7985	-13,8353	52,6985	20,9958
50,9185	-16,6688	51,8185	-1,5514	52,7185	13,8290
50,9385	-3,5382	51,8385	-6,8047	52,7385	6,9808
50,9585	-22,0894	51,8585	4,6445	52,7585	10,9706
50,9785	-21,6296	51,8785	3,8554	52,7785	-4,4613
50,9985	-17,5923	51,8985	7,0065	52,7985	-19,7803
51,0185	-21,2949	51,9185	-10,2377	52,8185	-5,8160
51,0385	-25,9842	51,9385	-13,0598	52,8385	14,5195
51,0585	-13,3501	51,9585	11,2333	52,8585	22,9820
51,0785	-0,5214	51,9785	3,7021	52,8785	-9,8941
51,0985	-15,3164	51,9985	-13,6699	52,8985	-17,8242
51,1185	-4,7827	52,0185	4,1722	52,9185	-16,6963
51,1385	5,7883	52,0385	6,2960	52,9385	-17,5692

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
52,9585	-6,4484	53,8585	28,7408	54,7585	94,8812
52,9785	-4,8474	53,8785	-8,2956	54,7785	147,2798
52,9985	4,6191	53,8985	8,3324	54,7985	235,3962
53,0185	0,9226	53,9185	2,4718	54,8185	334,2443
53,0385	-6,9022	53,9385	30,1884	54,8385	414,4980
53,0585	7,3369	53,9585	2,1228	54,8585	428,4605
53,0785	15,7197	53,9785	6,5926	54,8785	292,5347
53,0985	17,8365	53,9985	-8,6434	54,8985	191,9776
53,1185	3,5091	54,0185	6,1394	54,9185	155,1457
53,1385	4,6403	54,0385	-2,1001	54,9385	158,1968
53,1585	20,7097	54,0585	-23,5622	54,9585	183,2002
53,1785	13,0726	54,0785	-18,9242	54,9785	233,5637
53,1985	11,9790	54,0985	29,1832	54,9985	248,4779
53,2185	6,6064	54,1185	-11,9288	55,0185	193,3449
53,2385	-4,5525	54,1385	15,6119	55,0385	139,9722
53,2585	-11,9160	54,1585	3,5533	55,0585	83,8281
53,2785	-6,0857	54,1785	12,0657	55,0785	51,3562
53,2985	20,6716	54,1985	4,2310	55,0985	60,1092
53,3185	24,6353	54,2185	-9,6056	55,1185	49,3049
53,3385	8,0472	54,2385	-27,4744	55,1385	43,9220
53,3585	14,2278	54,2585	-6,8546	55,1585	51,8563
53,3785	10,1194	54,2785	-11,3678	55,1785	47,9445
53,3985	17,0678	54,2985	14,8609	55,1985	49,4402
53,4185	22,4352	54,3185	11,4076	55,2185	68,0621
53,4385	13,0180	54,3385	30,5960	55,2385	77,2482
53,4585	-7,9468	54,3585	6,5033	55,2585	74,2447
53,4785	23,4175	54,3785	15,7065	55,2785	81,2658
53,4985	35,6942	54,3985	25,8783	55,2985	93,9353
53,5185	14,5429	54,4185	21,7291	55,3185	95,4024
53,5385	15,5110	54,4385	22,3959	55,3385	73,5553
53,5585	8,7554	54,4585	27,6251	55,3585	52,3448
53,5785	16,0145	54,4785	11,5930	55,3785	21,5511
53,5985	35,4423	54,4985	23,8933	55,3985	14,3906
53,6185	29,3107	54,5185	11,3554	55,4185	48,3971
53,6385	16,2996	54,5385	20,7166	55,4385	54,9403
53,6585	33,7356	54,5585	25,9765	55,4585	48,7601
53,6785	34,6446	54,5785	20,0625	55,4785	36,9382
53,6985	51,0939	54,5985	28,2876	55,4985	27,5769
53,7185	-10,7351	54,6185	26,3723	55,5185	32,9852
53,7385	25,9937	54,6385	34,7076	55,5385	34,3310
53,7585	8,5913	54,6585	30,8439	55,5585	45,5609
53,7785	-15,1537	54,6785	27,6242	55,5785	27,3532
53,7985	-5,7120	54,6985	24,2952	55,5985	40,3761
53,8185	5,0868	54,7185	32,4413	55,6185	11,4264
53,8385	-0,6092	54,7385	78,6903	55,6385	1,8828

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
55,6585	24,7887	56,5585	35,5973	57,4585	40,8013
55,6785	17,0942	56,5785	48,1183	57,4785	42,2766
55,6985	13,2069	56,5985	23,1709	57,4985	54,7456
55,7185	15,6076	56,6185	19,1767	57,5185	52,0511
55,7385	14,8096	56,6385	53,6852	57,5385	53,6440
55,7585	38,4205	56,6585	25,0672	57,5585	51,3665
55,7785	32,0870	56,6785	23,9785	57,5785	45,9398
55,7985	38,0315	56,6985	17,6470	57,5985	34,6156
55,8185	32,4119	56,7185	39,3028	57,6185	50,5491
55,8385	29,2157	56,7385	24,4869	57,6385	31,3855
55,8585	31,2767	56,7585	3,4673	57,6585	6,8005
55,8785	29,3407	56,7785	-0,3057	57,6785	10,5968
55,8985	29,0128	56,7985	19,1627	57,6985	14,0128
55,9185	16,2131	56,8185	0,9504	57,7185	6,5721
55,9385	11,2558	56,8385	-15,6690	57,7385	19,3248
55,9585	45,2871	56,8585	-9,1715	57,7585	17,0417
55,9785	3,7074	56,8785	-5,2108	57,7785	11,2381
55,9985	3,8587	56,8985	10,1113	57,7985	15,1804
56,0185	10,7593	56,9185	-2,2465	57,8185	29,6207
56,0385	14,3586	56,9385	7,4418	57,8385	12,8795
56,0585	5,3125	56,9585	11,1573	57,8585	-2,1072
56,0785	11,5451	56,9785	11,0907	57,8785	-9,7269
56,0985	-14,7251	56,9985	17,9798	57,8985	11,1104
56,1185	-7,6376	57,0185	18,7234	57,9185	19,7472
56,1385	28,4276	57,0385	-2,8873	57,9385	12,5986
56,1585	11,9713	57,0585	-18,0692	57,9585	2,6067
56,1785	-0,7874	57,0785	5,5857	57,9785	5,5145
56,1985	-14,4152	57,0985	24,5005	57,9985	-0,4191
56,2185	23,8320	57,1185	26,6296	58,0185	4,3861
56,2385	12,1874	57,1385	21,1757	58,0385	-2,3862
56,2585	35,1453	57,1585	57,9184	58,0585	0,8224
56,2785	16,8862	57,1785	66,9792	58,0785	3,9254
56,2985	5,0456	57,1985	45,2691	58,0985	9,4059
56,3185	6,7617	57,2185	75,5371	58,1185	-5,1803
56,3385	32,7880	57,2385	78,6226	58,1385	-9,8391
56,3585	46,5035	57,2585	55,1842	58,1585	9,5407
56,3785	25,9382	57,2785	57,5993	58,1785	0,3532
56,3985	7,9056	57,2985	69,8113	58,1985	-2,6930
56,4185	32,3821	57,3185	79,8148	58,2185	13,2331
56,4385	14,1257	57,3385	75,8922	58,2385	8,8964
56,4585	9,4354	57,3585	72,9602	58,2585	9,0283
56,4785	42,9249	57,3785	81,7400	58,2785	4,5495
56,4985	22,0541	57,3985	71,0146	58,2985	1,6643
56,5185	43,8029	57,4185	48,9875	58,3185	-15,0041
56,5385	54,6937	57,4385	49,7532	58,3385	9,3925

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
58,3585	6,1353	59,2585	23,2862	60,1585	103,5777
58,3785	36,3171	59,2785	21,7036	60,1785	71,1478
58,3985	6,4274	59,2985	14,7353	60,1985	54,2325
58,4185	2,4063	59,3185	5,3587	60,2185	41,2510
58,4385	30,5778	59,3385	6,2393	60,2385	15,3656
58,4585	34,5586	59,3585	11,5004	60,2585	29,5823
58,4785	40,9835	59,3785	17,9547	60,2785	15,8142
58,4985	33,7532	59,3985	5,9000	60,2985	3,7230
58,5185	20,0029	59,4185	-15,2429	60,3185	14,2298
58,5385	8,6154	59,4385	1,1979	60,3385	16,2114
58,5585	17,1595	59,4585	5,7067	60,3585	16,0696
58,5785	9,1395	59,4785	-8,5389	60,3785	10,9792
58,5985	24,3545	59,4985	2,7676	60,3985	30,1096
58,6185	-2,2055	59,5185	4,3838	60,4185	11,7752
58,6385	8,6074	59,5385	22,7996	60,4385	25,7118
58,6585	31,2468	59,5585	35,2499	60,4585	25,8118
58,6785	12,7089	59,5785	2,3110	60,4785	14,0672
58,6985	-3,3233	59,5985	-4,9537	60,4985	41,2722
58,7185	28,4720	59,6185	15,0093	60,5185	6,4396
58,7385	0,8513	59,6385	34,2294	60,5385	28,1228
58,7585	10,0284	59,6585	14,0444	60,5585	34,9337
58,7785	35,5360	59,6785	7,9167	60,5785	45,7032
58,7985	18,9608	59,6985	15,8859	60,5985	54,8474
58,8185	23,4044	59,7185	20,0422	60,6185	22,6155
58,8385	26,2499	59,7385	40,8599	60,6385	39,6178
58,8585	19,9809	59,7585	61,1069	60,6585	35,5302
58,8785	4,3267	59,7785	83,8416	60,6785	50,0083
58,8985	0,1741	59,7985	108,8529	60,6985	51,1345
58,9185	6,6380	59,8185	159,2930	60,7185	50,1917
58,9385	5,2892	59,8385	222,0312	60,7385	51,0723
58,9585	0,0506	59,8585	313,7527	60,7585	62,3622
58,9785	-11,4597	59,8785	447,7722	60,7785	50,9659
58,9985	1,8371	59,8985	651,6575	60,7985	42,6453
59,0185	9,9254	59,9185	814,0826	60,8185	26,0068
59,0385	-3,5256	59,9385	879,3957	60,8385	34,0779
59,0585	-12,8821	59,9585	671,6145	60,8585	34,4050
59,0785	-6,5836	59,9785	417,8867	60,8785	43,3762
59,0985	-2,4180	59,9985	255,1779	60,8985	35,8300
59,1185	-11,9567	60,0185	232,0256	60,9185	36,9812
59,1385	-7,0377	60,0385	246,6234	60,9385	32,0975
59,1585	11,5502	60,0585	312,0648	60,9585	9,8871
59,1785	16,1853	60,0785	382,6995	60,9785	19,8056
59,1985	10,0093	60,0985	464,0795	60,9985	51,9988
59,2185	6,4855	60,1185	375,7268	61,0185	27,4780
59,2385	16,3000	60,1385	232,1293	61,0385	22,5962

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
61,0585	35,6647	61,9585	-8,9820	62,8585	12,4638
61,0785	15,4932	61,9785	-4,3521	62,8785	4,7315
61,0985	28,4102	61,9985	8,1856	62,8985	11,5895
61,1185	29,7955	62,0185	19,6957	62,9185	23,0797
61,1385	28,2124	62,0385	4,8947	62,9385	2,1797
61,1585	15,3572	62,0585	-6,1930	62,9585	-0,8369
61,1785	42,6120	62,0785	-0,0865	62,9785	4,2876
61,1985	33,2515	62,0985	20,2904	62,9985	0,5908
61,2185	32,8249	62,1185	1,5132	63,0185	20,7150
61,2385	28,3380	62,1385	-5,4279	63,0385	-2,2363
61,2585	31,3147	62,1585	15,4715	63,0585	2,9687
61,2785	38,5836	62,1785	16,5147	63,0785	-14,2586
61,2985	32,8905	62,1985	-27,6075	63,0985	-1,9988
61,3185	29,7380	62,2185	-3,9068	63,1185	7,8337
61,3385	36,7546	62,2385	13,9194	63,1385	18,0263
61,3585	40,5974	62,2585	-3,7429	63,1585	16,5116
61,3785	28,3100	62,2785	-0,8557	63,1785	-4,6662
61,3985	38,3871	62,2985	-2,4142	63,1985	0,1022
61,4185	25,6420	62,3185	7,1756	63,2185	-2,8771
61,4385	13,5034	62,3385	5,4408	63,2385	-3,7461
61,4585	28,2092	62,3585	-13,3756	63,2585	-3,5140
61,4785	24,8444	62,3785	15,5609	63,2785	-0,2978
61,4985	19,2233	62,3985	-4,6616	63,2985	-1,4646
61,5185	21,9649	62,4185	10,0402	63,3185	-17,8480
61,5385	18,5060	62,4385	-2,7474	63,3385	-21,4248
61,5585	10,7050	62,4585	7,0564	63,3585	-3,7084
61,5785	16,2252	62,4785	-2,0644	63,3785	-17,4025
61,5985	18,3986	62,4985	18,6575	63,3985	-20,0527
61,6185	6,4299	62,5185	4,8322	63,4185	-5,1928
61,6385	-1,2942	62,5385	8,6244	63,4385	1,6673
61,6585	-4,1466	62,5585	31,1770	63,4585	1,6183
61,6785	1,8311	62,5785	6,4953	63,4785	1,3727
61,6985	12,5661	62,5985	-2,9453	63,4985	-3,2994
61,7185	9,8249	62,6185	19,7981	63,5185	-4,6259
61,7385	-4,9984	62,6385	25,1889	63,5385	-2,9547
61,7585	-7,3102	62,6585	6,2625	63,5585	-10,1680
61,7785	-8,3150	62,6785	13,3376	63,5785	-10,4582
61,7985	0,8876	62,6985	30,4097	63,5985	7,4075
61,8185	11,5975	62,7185	-8,8694	63,6185	15,9726
61,8385	4,9148	62,7385	-10,0090	63,6385	20,9489
61,8585	15,8535	62,7585	4,3709	63,6585	17,5667
61,8785	19,0729	62,7785	6,6996	63,6785	-0,4995
61,8985	5,2523	62,7985	14,4966	63,6985	-4,7799
61,9185	5,7256	62,8185	9,2648	63,7185	1,2437
61,9385	4,5987	62,8385	-4,8226	63,7385	3,0382

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
63,7585	-3,3764	64,6585	26,0233	65,5585	18,4790
63,7785	-10,0450	64,6785	39,9995	65,5785	28,2369
63,7985	-11,8910	64,6985	32,7607	65,5985	50,3178
63,8185	2,5475	64,7185	49,1309	65,6185	54,5730
63,8385	-2,8572	64,7385	4,1536	65,6385	51,0362
63,8585	-0,2563	64,7585	-5,3581	65,6585	45,8026
63,8785	12,6739	64,7785	16,0235	65,6785	44,1023
63,8985	29,9198	64,7985	32,6555	65,6985	33,2136
63,9185	47,2027	64,8185	11,9240	65,7185	15,2447
63,9385	67,1857	64,8385	28,4865	65,7385	13,1455
63,9585	98,9101	64,8585	3,4831	65,7585	24,7938
63,9785	114,4918	64,8785	25,6279	65,7785	23,7970
63,9985	143,8276	64,8985	17,6160	65,7985	18,6237
64,0185	165,2770	64,9185	40,5956	65,8185	34,6458
64,0385	131,6287	64,9385	22,0731	65,8385	34,7127
64,0585	76,2602	64,9585	1,7725	65,8585	17,8804
64,0785	28,0489	64,9785	20,8632	65,8785	9,0381
64,0985	17,5998	64,9985	35,3042	65,8985	5,6380
64,1185	53,7412	65,0185	21,8214	65,9185	5,3544
64,1385	53,7266	65,0385	3,2576	65,9385	5,3166
64,1585	65,2650	65,0585	-0,7505	65,9585	-10,6963
64,1785	79,7719	65,0785	0,0123	65,9785	-10,6895
64,1985	72,6870	65,0985	29,5107	65,9985	0,5365
64,2185	61,7441	65,1185	26,1774	66,0185	8,3824
64,2385	36,5030	65,1385	34,4546	66,0385	14,5924
64,2585	4,8661	65,1585	28,4749	66,0585	22,1659
64,2785	2,8199	65,1785	8,2815	66,0785	15,1409
64,2985	-18,0828	65,1985	-9,8186	66,0985	16,9314
64,3185	1,1229	65,2185	7,8941	66,1185	32,0800
64,3385	5,2826	65,2385	2,5645	66,1385	-13,6751
64,3585	23,1697	65,2585	-6,0758	66,1585	-19,4097
64,3785	9,1255	65,2785	3,2945	66,1785	-3,7497
64,3985	-6,2043	65,2985	-3,0713	66,1985	-2,5766
64,4185	14,5018	65,3185	-1,0857	66,2185	-6,5935
64,4385	3,2591	65,3385	10,8043	66,2385	6,5692
64,4585	-6,7211	65,3585	11,8309	66,2585	1,1803
64,4785	22,8969	65,3785	4,4159	66,2785	13,2785
64,4985	57,8867	65,3985	4,4653	66,2985	17,2512
64,5185	11,3772	65,4185	17,0658	66,3185	27,1046
64,5385	25,0942	65,4385	10,9902	66,3385	17,8135
64,5585	37,0721	65,4585	18,7687	66,3585	6,3082
64,5785	6,4320	65,4785	26,7605	66,3785	26,7545
64,5985	11,7863	65,4985	21,3722	66,3985	12,7691
64,6185	36,5636	65,5185	20,9347	66,4185	2,9687
64,6385	36,6686	65,5385	23,8957	66,4385	4,5193

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
66,4585	14,0240	67,3585	4,9552	68,2585	458,4336
66,4785	24,5578	67,3785	4,7553	68,2785	547,0426
66,4985	-11,6427	67,3985	17,9009	68,2985	593,7827
66,5185	-15,1914	67,4185	22,8687	68,3185	494,6598
66,5385	5,2818	67,4385	14,3900	68,3385	307,8265
66,5585	9,3333	67,4585	2,5004	68,3585	199,7408
66,5785	-8,3098	67,4785	20,7194	68,3785	134,8059
66,5985	-12,5202	67,4985	20,8512	68,3985	135,7914
66,6185	11,0199	67,5185	30,3599	68,4185	122,9624
66,6385	-2,0374	67,5385	50,6496	68,4385	142,8394
66,6585	-21,4516	67,5585	55,5597	68,4585	186,6402
66,6785	2,8503	67,5785	81,1339	68,4785	216,0705
66,6985	8,0280	67,5985	137,6963	68,4985	167,4992
66,7185	6,4375	67,6185	204,2144	68,5185	111,4224
66,7385	-17,2571	67,6385	287,8853	68,5385	86,6702
66,7585	12,2717	67,6585	366,8890	68,5585	50,3244
66,7785	-20,2258	67,6785	418,8562	68,5785	21,1354
66,7985	11,2615	67,6985	489,4671	68,5985	18,8781
66,8185	6,0538	67,7185	522,5095	68,6185	-1,4894
66,8385	6,7092	67,7385	415,1236	68,6385	-34,6675
66,8585	13,1167	67,7585	257,6775	68,6585	-5,5236
66,8785	11,5055	67,7785	183,6181	68,6785	-0,3347
66,8985	9,2532	67,7985	158,4312	68,6985	7,8134
66,9185	1,5725	67,8185	158,9901	68,7185	15,9280
66,9385	3,5518	67,8385	171,6197	68,7385	-0,2476
66,9585	19,7575	67,8585	192,7124	68,7585	-5,7532
66,9785	7,1183	67,8785	239,8344	68,7785	0,3175
66,9985	6,1476	67,8985	259,0754	68,7985	9,8302
67,0185	-3,5902	67,9185	251,4823	68,8185	0,5069
67,0385	19,0366	67,9385	236,4339	68,8385	-19,3150
67,0585	32,0021	67,9585	180,1391	68,8585	-14,5197
67,0785	-13,7704	67,9785	133,8370	68,8785	-9,6461
67,0985	17,3486	67,9985	155,7525	68,8985	-7,8615
67,1185	13,5291	68,0185	174,9981	68,9185	-9,8283
67,1385	10,8819	68,0385	225,5899	68,9385	-5,3391
67,1585	16,4180	68,0585	276,3683	68,9585	-14,7731
67,1785	20,6912	68,0785	357,1517	68,9785	3,4191
67,1985	21,4135	68,0985	432,2303	68,9985	3,4669
67,2185	-6,0400	68,1185	437,1837	69,0185	-5,9598
67,2385	-14,8101	68,1385	400,8233	69,0385	-7,7457
67,2585	18,1806	68,1585	309,8152	69,0585	-26,0931
67,2785	2,4025	68,1785	294,8637	69,0785	8,4059
67,2985	24,4048	68,1985	294,8754	69,0985	-27,0830
67,3185	24,3682	68,2185	288,2873	69,1185	-17,7106
67,3385	12,8301	68,2385	371,4489	69,1385	-13,0333

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
69,1585	-10,2980	70,0585	3,3271	70,9585	-11,6344
69,1785	6,0162	70,0785	12,5827	70,9785	-2,0674
69,1985	8,0773	70,0985	6,6565	70,9985	-18,7986
69,2185	-13,7793	70,1185	15,2280	71,0185	-23,1994
69,2385	9,3210	70,1385	16,0673	71,0385	-9,2424
69,2585	25,8288	70,1585	17,2531	71,0585	6,3314
69,2785	29,7853	70,1785	23,6171	71,0785	-22,1464
69,2985	14,3915	70,1985	-0,1869	71,0985	14,7642
69,3185	12,9903	70,2185	7,4962	71,1185	-2,7237
69,3385	18,3294	70,2385	6,3585	71,1385	-2,0388
69,3585	43,1677	70,2585	-2,0090	71,1585	-8,3150
69,3785	11,4695	70,2785	0,4255	71,1785	-18,0759
69,3985	10,1696	70,2985	-7,4621	71,1985	-19,4570
69,4185	-2,6908	70,3185	11,7064	71,2185	-3,9675
69,4385	5,3436	70,3385	10,2555	71,2385	-19,1133
69,4585	10,1590	70,3585	16,7173	71,2585	6,0491
69,4785	13,1298	70,3785	9,0774	71,2785	-4,4986
69,4985	-4,8974	70,3985	8,8332	71,2985	-2,5896
69,5185	16,0232	70,4185	1,1296	71,3185	-9,2624
69,5385	28,3900	70,4385	10,9784	71,3385	11,8805
69,5585	14,7002	70,4585	-4,8193	71,3585	2,9941
69,5785	4,0877	70,4785	2,7951	71,3785	-2,9084
69,5985	1,5023	70,4985	3,3113	71,3985	-0,5116
69,6185	-1,8061	70,5185	-0,2228	71,4185	1,5819
69,6385	1,4192	70,5385	10,7521	71,4385	-14,2652
69,6585	6,3994	70,5585	2,1633	71,4585	3,3479
69,6785	8,9884	70,5785	-2,5192	71,4785	-7,6513
69,6985	4,4555	70,5985	4,4276	71,4985	-12,3273
69,7185	19,2492	70,6185	1,0386	71,5185	-22,3445
69,7385	15,9209	70,6385	-5,8402	71,5385	1,7756
69,7585	-3,7185	70,6585	-6,4883	71,5585	5,3958
69,7785	-9,5496	70,6785	22,4339	71,5785	-8,3341
69,7985	-6,2010	70,6985	2,5780	71,5985	5,0614
69,8185	-3,3598	70,7185	10,1908	71,6185	-2,6592
69,8385	9,0493	70,7385	14,0706	71,6385	-2,4511
69,8585	13,6641	70,7585	15,2936	71,6585	-15,2938
69,8785	-3,6217	70,7785	17,3291	71,6785	-11,9045
69,8985	-15,8181	70,7985	7,1431	71,6985	0,8460
69,9185	1,0241	70,8185	4,0902	71,7185	5,8392
69,9385	15,2004	70,8385	-15,0339	71,7385	2,8119
69,9585	-5,9605	70,8585	-8,2291	71,7585	-1,7280
69,9785	-8,0602	70,8785	14,1665	71,7785	8,8796
69,9985	15,9405	70,8985	-3,8472	71,7985	0,6956
70,0185	20,6612	70,9185	-0,4199	71,8185	-4,1266
70,0385	7,4775	70,9385	-10,4154	71,8385	-5,7869

Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem	Posição 2θ	Contagem
71,8585	-9,3473	72,7585	10,8662	73,6585	66,3607
71,8785	-5,3929	72,7785	16,9636	73,6785	58,4727
71,8985	-2,7456	72,7985	16,8552	73,6985	37,1910
71,9185	11,4763	72,8185	24,9344	73,7185	20,2079
71,9385	17,5829	72,8385	4,5548	73,7385	11,9674
71,9585	15,1154	72,8585	19,6320	73,7585	-12,6645
71,9785	7,9589	72,8785	22,5035	73,7785	-0,0368
71,9985	-14,3756	72,8985	1,2024	73,7985	-8,3377
72,0185	-14,4203	72,9185	8,2621	73,8185	-8,4581
72,0385	-15,0782	72,9385	12,1238	73,8385	7,0442
72,0585	-12,0570	72,9585	-6,8157	73,8585	3,2771
72,0785	-12,7855	72,9785	8,3605	73,8785	-3,5742
72,0985	-30,5174	72,9985	-2,9766	73,8985	-8,9577
72,1185	-14,7887	73,0185	-1,1495	73,9185	-4,2545
72,1385	-21,1942	73,0385	-3,1831	73,9385	1,1982
72,1585	-40,9210	73,0585	-11,1926	73,9585	-12,7835
72,1785	-26,4628	73,0785	4,4436	73,9785	-5,4982
72,1985	-14,6720	73,0985	-12,0987	73,9985	2,6976
72,2185	-10,4453	73,1185	11,7704	74,0185	6,6822
72,2385	0,0319	73,1385	-30,8249	74,0385	15,7200
72,2585	-5,0079	73,1585	-44,0500	74,0585	-0,4383
72,2785	-1,6036	73,1785	-22,2136	74,0785	-11,2981
72,2985	-6,2411	73,1985	4,2593	74,0985	-3,7995
72,3185	9,1242	73,2185	4,2648	74,1185	7,3441
72,3385	-1,9282	73,2385	1,2036	74,1385	13,6327
72,3585	-11,6228	73,2585	-12,6845	74,1585	2,6991
72,3785	-1,0382	73,2785	-17,7266	74,1785	-8,3556
72,3985	-3,9682	73,2985	-27,1506	74,1985	-6,7412
72,4185	-7,0172	73,3185	4,0263	74,2185	1,8940
72,4385	7,7893	73,3385	2,4578	74,2385	7,4200
72,4585	-4,7428	73,3585	15,9636	74,2585	5,1803
72,4785	-4,7988	73,3785	49,7222	74,2785	0,6001
72,4985	1,4168	73,3985	63,6093	74,2985	-1,2743
72,5185	3,7970	73,4185	115,5784	74,3185	-8,2477
72,5385	8,9596	73,4385	118,8392	74,3385	-12,7320
72,5585	24,8719	73,4585	106,4829	74,3585	2,4470
72,5785	18,8699	73,4785	72,0854	74,3785	21,1791
72,5985	-3,0558	73,4985	31,4829	74,3985	14,6864
72,6185	8,0203	73,5185	29,7487	74,4185	-2,5716
72,6385	-5,2854	73,5385	10,1917	74,4385	1,6281
72,6585	7,6960	73,5585	19,5302	74,4585	-22,6331
72,6785	18,5276	73,5785	30,4835	74,4785	-21,2055
72,6985	8,6185	73,5985	48,0503	74,4985	-17,0909
72,7185	8,8957	73,6185	39,4070	74,5185	-16,7728
72,7385	-2,2699	73,6385	40,0933	74,5385	-7,5651

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
74,5585	-2,0619	75,4585	7,8357	76,3585	-1,9417
74,5785	1,5481	75,4785	16,0057	76,3785	-7,4116
74,5985	-15,3324	75,4985	22,5621	76,3985	-2,5787
74,6185	-17,5536	75,5185	35,9695	76,4185	-15,6614
74,6385	-22,6055	75,5385	88,2969	76,4385	-17,0134
74,6585	-2,9877	75,5585	71,8278	76,4585	-6,0266
74,6785	23,7489	75,5785	105,3061	76,4785	-11,2204
74,6985	20,8932	75,5985	120,6953	76,4985	-2,5744
74,7185	1,4420	75,6185	144,7114	76,5185	14,8506
74,7385	0,0391	75,6385	206,6344	76,5385	2,3883
74,7585	-5,3531	75,6585	175,0034	76,5585	4,2221
74,7785	-9,0060	75,6785	118,6759	76,5785	6,0499
74,7985	-33,1601	75,6985	73,6513	76,5985	8,2734
74,8185	4,4493	75,7185	43,7081	76,6185	-11,5950
74,8385	2,7435	75,7385	28,0949	76,6385	3,7863
74,8585	-5,1975	75,7585	47,4377	76,6585	-2,6838
74,8785	4,8135	75,7785	33,3123	76,6785	1,1536
74,8985	-6,4360	75,7985	56,8858	76,6985	11,1830
74,9185	9,3423	75,8185	96,0407	76,7185	-10,2097
74,9385	-5,6857	75,8385	100,0004	76,7385	6,4383
74,9585	0,1693	75,8585	110,2252	76,7585	10,4092
74,9785	-12,8012	75,8785	101,4205	76,7785	4,7456
74,9985	0,5930	75,8985	70,5721	76,7985	6,7125
75,0185	-4,6962	75,9185	31,9077	76,8185	27,9822
75,0385	-3,3538	75,9385	20,7339	76,8385	-0,5151
75,0585	16,3467	75,9585	9,9982	76,8585	3,7172
75,0785	-8,9180	75,9785	0,6105	76,8785	15,8302
75,0985	-2,6724	75,9985	-3,1627	76,8985	-3,7045
75,1185	9,6149	76,0185	2,9416	76,9185	15,6445
75,1385	-6,2486	76,0385	8,6124	76,9385	-27,9833
75,1585	-24,1488	76,0585	-0,5103	76,9585	-16,7589
75,1785	3,3885	76,0785	-1,9171	76,9785	-6,6450
75,1985	29,1711	76,0985	8,5476	76,9985	-12,2489
75,2185	-2,4825	76,1185	15,4947	77,0185	-8,6960
75,2385	2,2358	76,1385	7,1364	77,0385	-6,8173
75,2585	29,1159	76,1585	10,8198	77,0585	8,7304
75,2785	25,6153	76,1785	22,1104	77,0785	-3,5515
75,2985	20,5929	76,1985	18,5116	77,0985	16,9444
75,3185	11,9616	76,2185	-4,7332	77,1185	-31,7843
75,3385	17,5044	76,2385	-7,1531	77,1385	-4,1932
75,3585	6,3733	76,2585	0,0162	77,1585	-23,2244
75,3785	-7,5484	76,2785	-11,3776	77,1785	11,3231
75,3985	-0,2535	76,2985	-6,5754	77,1985	-7,3796
75,4185	29,7890	76,3185	-4,2035	77,2185	14,3843
75,4385	17,3054	76,3385	0,2296	77,2385	-12,2865

Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem	Posição 2 θ	Contagem
77,2585	-6,5007	78,1585	-7,8574	79,0585	-56,2236
77,2785	-17,5484	78,1785	1,6993	79,0785	-50,7232
77,2985	-11,8558	78,1985	-8,9366	79,0985	-52,4249
77,3185	13,2794	78,2185	-18,6978	79,1185	-55,3285
77,3385	-5,3618	78,2385	-18,4000	79,1385	-43,9808
77,3585	6,1696	78,2585	-28,0954	79,1585	-63,8484
77,3785	12,2104	78,2785	-21,6516	79,1785	-46,8607
77,3985	8,7477	78,2985	-7,0685	79,1985	-47,0834
77,4185	8,2404	78,3185	-15,2349	79,2185	-68,1318
77,4385	-5,6263	78,3385	-20,6404	79,2385	-62,7240
77,4585	-1,5669	78,3585	-17,4493	79,2585	-60,6901
77,4785	-8,3900	78,3785	-22,1669	79,2785	-71,8149
77,4985	16,2903	78,3985	-23,0844	79,2985	-56,7804
77,5185	15,1594	78,4185	-24,2271	79,3185	-89,8551
77,5385	22,9610	78,4385	-13,7451	79,3385	-34,9101
77,5585	43,9415	78,4585	-8,7175	79,3585	-90,6062
77,5785	50,3676	78,4785	-18,9557	79,3785	-49,2943
77,5985	37,4144	78,4985	-26,0408	79,3985	-64,8311
77,6185	84,4720	78,5185	-43,9255	79,4185	-81,0462
77,6385	92,0426	78,5385	-17,3621	79,4385	-75,9323
77,6585	76,7761	78,5585	4,7089	79,4585	-88,4597
77,6785	49,2966	78,5785	-3,5356	79,4785	-69,5455
77,6985	31,1805	78,5985	-1,4090	79,4985	-93,7913
77,7185	39,6864	78,6185	-0,4606	79,5185	-84,8396
77,7385	15,7227	78,6385	-10,9609	79,5385	-93,3717
77,7585	23,5648	78,6585	-26,8743	79,5585	-70,8971
77,7785	-4,6077	78,6785	-39,7530	79,5785	-78,6576
77,7985	11,7406	78,6985	-16,6831	79,5985	-88,8794
77,8185	16,6966	78,7185	-16,4336	79,6185	-85,9925
77,8385	19,3682	78,7385	-19,7279	79,6385	-80,4630
77,8585	24,3520	78,7585	-48,9712	79,6585	-70,4401
77,8785	34,8773	78,7785	-45,8703	79,6785	-95,5446
77,8985	27,3402	78,7985	-35,4134	79,6985	-82,0797
77,9185	17,5102	78,8185	-33,1864	79,7185	-80,4011
77,9385	16,5923	78,8385	-40,8210	79,7385	-28,6472
77,9585	6,9959	78,8585	-32,2701	79,7585	-5,1472
77,9785	13,7551	78,8785	-19,7570	79,7785	13,3172
77,9985	-14,0003	78,8985	-9,7884	79,7985	24,9210
78,0185	-20,3456	78,9185	-48,8491	79,8185	58,8982
78,0385	-18,5829	78,9385	-62,9009	79,8385	51,9810
78,0585	-34,7861	78,9585	-66,0011	79,8585	53,3738
78,0785	-20,3885	78,9785	-64,4353	79,8785	18,6927
78,0985	-14,4248	78,9985	-36,4218	79,8985	9,5422
78,1185	-29,7047	79,0185	-45,4251	79,9185	5,2568
78,1385	-20,6498	79,0385	-41,7625	79,9385	-20,1985

Posição 2θ	Contagem
79,9585	-42,8785
79,9785	-34,3666

Posição 2θ	Contagem
79,9985	-17,7331
80,0185	1,2790

APÊNDICE B – PROGRAMAÇÃO DA PLACA DE ARDUINO PARA O SISTEMA EM CASCATA PARA BIOMINERALIZAÇÃO DE CONCRETO

```
//Liquid Crystal Display i2C
```

```
#include <Wire.h>
```

```
#include <LiquidCrystal_I2C.h>
```

```
LiquidCrystal_I2C lcd(0x27,20,4); // endereço do LCD 16x2
```

```
//Sensores de umidade
```

```
#include "DHT.h"
```

```
#define DHTPIN1 5
```

```
#define DHTPIN2 6
```

```
#define DHTTYPE DHT22
```

```
DHT dht1(DHTPIN1, DHTTYPE);
```

```
DHT dht2(DHTPIN2, DHTTYPE);
```

```
void setup() {
```

```
  //Iniciando:
```

```
  dht1.begin();
```

```
dht2.begin();

lcd.init();

lcd.backlight();

//Mensagem Inicial:

lcd.setCursor(4,0);

lcd.print("Medindo");

lcd.setCursor(2,1);

lcd.print("umidades...");

delay(3000);

lcd.clear();

}

void loop() {

  delay(2000);

  float h1 = dht1.readHumidity();

  float t1 = dht1.readTemperature();

  float h2 = dht2.readHumidity();

  float t2 = dht2.readTemperature();

  float Dh = h1-h2;
```

```
//Parâmetro  
lcd.setCursor(4,0);  
lcd.print("Delta U:");  
  
//Medida  
lcd.setCursor(5,1);  
lcd.print(abs(Dh));  
lcd.print("%");  
}
```

**APÊNDICE C – DADOS DAS ABSORBÂNCIAS DAS SOLUÇÕES A 5000 mg·L⁻¹
DE CARBONATO DE CÁLCIO E LACTATO DE CÁLCIO**

Comprimento de Onda (μm)	Absorbância Carbonato	Absorbância Lactato
320	0,543	0,259
330	0,609	0,074
340	0,520	0,061
350	0,550	0,057
360	0,580	0,049
370	0,540	0,042
380	0,620	0,035
390	0,610	0,032
400	0,590	0,025
410	0,490	0,022
420	0,620	0,020
430	0,640	0,019
440	0,720	0,020
450	0,750	0,020
460	0,750	0,021
470	0,810	0,021
480	0,702	0,018
490	0,780	0,022
500	0,690	0,016
510	0,830	0,020
520	0,836	0,018
530	0,880	0,018
540	0,780	0,019
550	0,780	0,014
560	0,820	0,016
570	0,950	0,020
580	0,910	0,020
590	1,055	0,021
600	1,020	0,020
610	0,750	0,017
620	0,850	0,020
630	0,630	0,018
640	0,815	0,020
650	0,930	0,020
660	0,997	0,020
670	1,015	0,020
680	1,020	0,017
690	1,070	0,020
700	1,062	0,019
710	1,060	0,018
720	1,077	0,014
730	1,080	0,018
740	1,085	0,018
750	1,060	0,014

Comprimento de Onda (μm)	Absorbância Carbonato	Absorbância Lactato
760	1,030	0,018
770	0,830	0,018
780	1,010	0,016
790	1,070	0,016
800	1,115	0,016
810	1,120	0,025
820	1,240	0,020
830	1,110	0,014
840	1,100	0,014
850	1,100	0,014
860	1,120	0,015
870	0,864	0,014
880	0,930	0,013
890	1,140	0,014
900	1,090	0,013
910	1,140	0,014
920	1,130	0,013
930	1,130	0,011
940	0,780	0,009
950	1,130	0,009
960	1,140	0,010
970	1,130	0,011
980	1,210	0,006
990	1,210	0,009
1000	1,220	0,008
1010	1,260	0,009

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO NA CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS (<https://doi.org/10.3303/CET2079017>)

97



CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS

VOL. 79, 2020

Guest Editors: Enrico Bardone, Antonio Marzocchella, Marco Bravi
 Copyright © 2020, AIDIC Servizi S.r.l.
 ISBN 978-88-95608-77-8; ISSN 2283-9216



The Italian Association
 of Chemical Engineering
 Online at www.oetjournal.it

DOI: 10.3303/CET2079017

Biom mineralization of Calcium Carbonate by *Bacillus Cereus* for Self-Healing Biocement

Pedro P. F. Brasileiro^{a,b}, Rita C. F. Soares da Silva^b, Fernanda C. P. Rocha e Silva^b, Yana B. Brandão^{b,c}, Leonie A. Sarubbo^{b,d}, Mohand Benachour^{a,b}

^a Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Rua Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, Zip Code: 50740-521, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Rua Joaquim de Brito, n. 216, Boa Vista, Zip Code: 500070-280, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Academic Unit of Cabo de Santo Agostinho, Rodovia Arminio Guilherme, 2835, Garapu, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil.

^d Centre of Science and Technology, Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 528, Boa Vista, Zip Code: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brazil.
ppfbrasileiro@hotmail.com

Concrete cracks can induce the disruption of dams, bridges, tunnels, and some structures that assist the human life. The agglomeration component of the concrete and the most applied compound, the Portland Cement, can be utilized in combination with calcium lactate and the *Bacillus* bacteria to produce the crystals of CaCO₃ (raw material of the cement production) through adsorption, biom mineralization, and crystallization, reducing the risk of ruptures. Thus, a screening of the biotechnological potential of bacterium *Bacillus cereus* (UCP 1615) under a concentration of 10⁷ cells/mL was carried out to evaluate the production of CaCO₃ crystals with 20 g of the Portland Cement II (PC-II), and 0,58, 1,00, and 1,42 g of calcium lactate. These Petri Dishes were incubated at 28°C and during 168 h. Besides, the crystals produced the *B. cereus* were analysed by an X-Ray Diffractometer (XRD) to estimate the relation (%) between the mainly and possible components. After 17 h, some crystals had already started to appear in the Petri Dishes of 1,00 and 1,42 g of calcium lactate, and after 168 h, the crystals were scraped of all Petri Dishes. The diffractometric analyse of the condition with the highest lactate condition, of 1,42 g, presented percentages of 82% SiO₂ (basic structure of cement) and 18% CaCO₃. Therefore, the *B. cereus* strain shows a biotechnological potential to produce crystals of CaCO₃ and that this bacterium is able to be tested under different conditions of calcium lactate, microbial concentration, and water according to a factorial design.

Keywords: Concrete cracks. Calcium Lactate. Crystals. XRD.

1. Introduction

In the urban, building and industrial areas, effects of solar rays, winds, rainings, and any kind of weathering are able to wash out the concrete of structures as bridges and roads. The inside and outside cracks of this concrete will reduce the compressive, tensile, and flexural strength limits of the material, increasing the probability to cause any accident. Furthermore, the concrete composition is an essential factor to give a long shelf life for the concrete, requiring a suitable cement for the current application with the ideal proportions of water, and fine and coarse aggregates (Neville, 2016).

For the production of cement, initially, there is the extraction of limestone (CaCO₃) from mines with the addition of iron ore and clay. This mixture will enter into a precalcifier (at about 1000 °C) to release CO₂ and CaO and after into a rotational furnace (at about 1500 °C) to vitrify the clay, constituting a new mixture called clinker (Neville, 2016). These two processes represent the focus of the cement industry. Only this process represents approximately 5-7 % from all CO₂ production of the Earth, mainly because cement is the most utilized mixture of the world (Shanks et al., 2019).

Paper Received: 1 August 2019; Revised: 6 November 2019; Accepted: 24 February 2020
 Please cite this article as: Brasileiro P.P.F., De Cássia Freire Soares Da Silva R., Cristina Padilha Da Rocha E Silva F., Batista Brandao Y., Asfora Sarubbo L., Benachour M., 2020, Biom mineralization of Calcium Carbonate by *Bacillus Cereus* for Self-healing Biocement, Chemical Engineering Transactions, 79, 97-102 DOI:10.3303/CET2079017

The clinker can be combined with a diversity of compounds as plaster (CaSO_4), slag (SiO_2), pozzolan (silicates), filler (CaCO_3), and including the same limestone utilized before the clinker formation in order to reduce the cost of the combustion from the precalcifier and also the release of CO_2 in the atmosphere. These mixtures will characterize the cement with a variety of compositions (Neville, 2016).

In Brazil, the legislation through the NBR 16697 unified the older standards that specified the composition of the different kinds of Portland Cement (PC). This classification can divide the cements in five groups with: I) at least 95 % of clinker with one or more kind of plaster; II) with a maximum mixture of 94 % of clinker with one or more kind of plaster; III) an elevated percentual of slags utilized in heavy constructions; IV) an elevated percentual of pozzolans to reduce the corrosion and the permeability; and V) a lower amount of additives, ensuring a higher initial strength since the first day (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2018).

The combination between cement, water and aggregates will compose the concrete, depending of the application. For common uses, there are pumpable, reinforced and a diversity of concretes, and for new trends, there is the self-healing concrete, for example (Neville, 2016).

A self-healing concrete should present: 1) an efficient sealing; 2) a compatibility from a healing agent with the concrete matrix; 3) a long shelf-life; and 4) an eco-friendly viability. The healing agent can be polymeric, inorganic, or biological. The first two present the disadvantage to react chemically in a wide range of temperature. This is a disadvantage because at any moment the self-healing reaction should stop to avoid the excess of self-healing chemical agent into the concrete matrix (Sidiq et al., 2019).

In this sense, self-healing biological agents as the bacteria *Bacillus* are able to recover cracks inside and outside concrete with a controlled range of temperature by the biomineralization. This phenomenon is usually known as the inorganic precipitation from organisms and microorganisms as: the pearl formed by oysters as a defense mechanism; the production of gold from kinds of bacteria; and the calcium carbonate precipitation by *Bacillus* bacteria in the self-healing concrete (Bastrzyk et al., 2019; Zhang et al., 2019).

There are some biomechanisms that the *Bacillus* species utilize to produce calcium carbonate, depending of the medium. The ureolytic and denitrifying biomechanisms are pathways to convert urea and organics compounds, respectively, into the intended inorganic compound with celerity, however there are two sequential disadvantages: the production of ammonium that can be converted into nitrous or nitric acids according to the nitrogen cycle, raising the corrosion in reinforced concrete for example; and the generation of a suitable environment for *Thiobacillus* species due to the lower pHs, whose presence may causes the concrete degradation (Sidiq et al., 2019; Vijay et al., 2017).

On the other hand, the biochemical mechanism by aerobic oxidation from calcium lactate in Equation 1 will produce the calcium carbonate, water, and carbon dioxide. This dioxide will be combined with some hydrated lime in cement or in concrete to produce more calcium carbonate, according to the Equation 2. This set of reactions is not as faster as the ureolytic and denitrifying biomechanisms, but it will crystallize CaCO_3 with lower risks of concrete degradation (Sidiq et al., 2019; Vijay et al., 2017).



Crystallization is a phenomenon that can build geometric inorganic structures with the concentration of a saturated solution. That can be exemplified when steam collides against dust grains under conditions of temperature and pressure, forming the hexagonal snowflakes. In the biomineralization of CaCO_3 under the calcium lactate biomechanism, three processes are in evidence: the adsorption of the microorganism into calcium lactate, the biochemical and chemical reactions, and finally the crystallization of CaCO_3 (Foust et al., 2013).

Crystals formed by biomineralization can be analysed according to the composition using the X-Ray Diffraction (XRD). This petrographic technique consists on the application of an x-ray beam on a sample. The deviation of the rays will compose a crystallographic profile that can be compared to a diversity of samples profiles around the world (Mors, Jonkers, 2017).

This data infinity can be easier to analyse if a tool that can build a diffractogram, identify the peaks, and distinguish these peaks is used. In this sense, the HighScore Plus® of the PANalytical B.V.® is a software that can reduce the analyse time with an effective comparison of the diffractograms database of inorganic compounds, allowing the user to select which compound will probably be in the crystallographic analysis (Kaur et al., 2017).

Therefore, the aim of this work was to screen the crystal production of CaCO_3 under the calcium lactate biomechanism, utilizing the bacterium *Bacillus cereus* (UCP 1615) into a Portland Cement II to investigate the biotechnological potential of *Bacillus cereus* as a biomineralizer microorganism.

2. Material and Methods

2.1 Microorganism and Maintenance and Growing Media

The biomineralizer bacterium was the *Bacillus cereus* (UCP 1615), the maintenance medium of the microorganism to conserve the strain was Agar Nutrient (AN), and the growing media was the Nutrient Broth (NB). Strain of *B. cereus* was pre-inoculated aseptically from AN to NB medium to activate the bacterium in 125 mL Erlenmeyer Flasks, under an agitation of 200 rpm and 28 °C, and during 24 h (Ostendorf et al., 2019). The microorganism utilized was cataloged in the Catholic University of Pernambuco which has a biotechnological potential to produce biosurfactants. The alcoholic fermentation also occurs in the production of crystals of calcium carbonate by the release of CO₂, justifying the choice of the microorganism.

2.2 Production Media

The biomineralization of calcium carbonate had the production medium composed by: 20 g of PC II; 0.58, 1.00, and 1.42 g of calcium lactate; and 10 mL of distilled water. This distribution occurred to follow future conditions of an experimental design called Central Composite Rotatable Design (CCRD) and to maintain the relation water/cement in a range from 40 to 60 % (m/m) (Zheng et al., 2017). This production medium was mixed manually in Petri Dishes, as illustrated in Figure 1, dried in a drying oven under 50 °C under 4 h, and decontaminated by an ultraviolet radiation inside a laminar flow chamber.

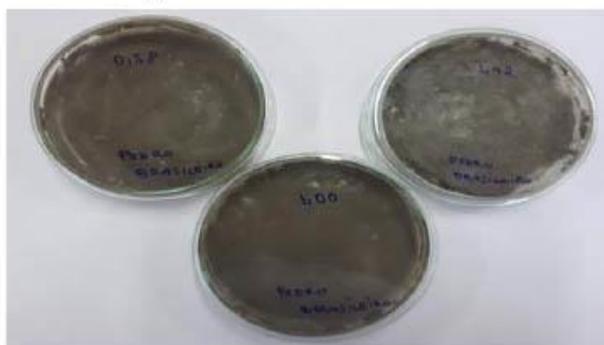


Figure 1: Production medium before the drying oven

2.3 Crystal Production

A 1 mL volume of growing medium containing a concentration of 10⁷ cells/mL, analyzed by optical density through an ultraviolet spectrometer, was inoculated aseptically on the Petri Dishes with the dried production medium.

The samples were maintained inside a drying oven, under 28 °C and during 168 h to ensure the adsorption, biochemical and chemical reactions (Equations 1 and 2), and crystallization processes.

2.4 Crystallographic Analysis

The diffractometer Bruker D2 PHASER, under a voltage of 30 kV, a current intensity of 10 mA, and a radiation of Cu- K α under 1.54 Å. The screening was made between 10 and 80 ° with a step of 1,0 s and angle of 2 θ (Lam et al., 2010).

The software HighScore Plus® of the PANalytical B.V.® was utilized to compose the diffractogram with a Rietveld refinement. This tool could also quantify the peak relation (%) between the common components in PC II compared with the software database.

3. Results and Discussion

3.1 Crystal Production

After 17 h of production, in the Figure 2, there was observed that crystals had being formed in the surrounding of Petri Dishes by a higher contact with the air on the three Petri Dishes, according to the Equation 1. Besides, the Petri Dish with 1.42 g of calcium lactate have presented some crystals on the middle of the dish by the elevated concentration of lactate. These features indicated the requirement of an aeration flow inside the

100

dishes with filters on the inlet and outlet flows to avoid the contamination of external microorganisms. As an alternative, it is possible to construct a workable model with a 3D printer and to combine with a microcontroller to produce a prototype with aeration.

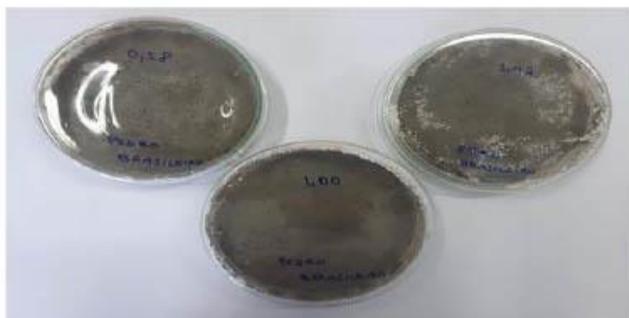


Figure 2: Crystal production after 17 h on the three Petri Dishes

After 168 h of experiment, the crystals were more evident at the end of the process, as can be seen in the Figure 3 on Petri Dishes and Figure 4 under an optical microscopy view, mainly on 1.42 g Petri Dish. These crystals were collected using platinum handles to reduce the number of cement grains. Amounts of crystals were sent to XRD analysis.



Figure 3: Crystal production after 168 h on the 1.42 g calcium lactate Petri Dish



Figure 4: Optical microscopy of crystals of *Bacillus cereus*

3.2 Crystallographic Analysis

The XRD analysis resulted in 82 % of SiO_2 and 18 % of CaCO_3 , considering the peak percentual. This distribution might indicate that particles of SiO_2 must have spread from the cement to inoculum volume. Probably, at the moment that the liquid was evaporating, the bioreaction of Equation 1 and the reaction of Equation 2 had also been occurring with the crystallization of these components.

In the Figure 5A, it can be observed that the crystals obtained from *Bacillus cereus* presented an elevated compatibility with the bioconcrete obtained by a *Bacillus* specie, in the Figure 5B (Lucas et al., 2018), according to the comparison between the diffractograms. In this experiment the authors combined bacterium spores, calcium lactate, and the concrete CEM I.

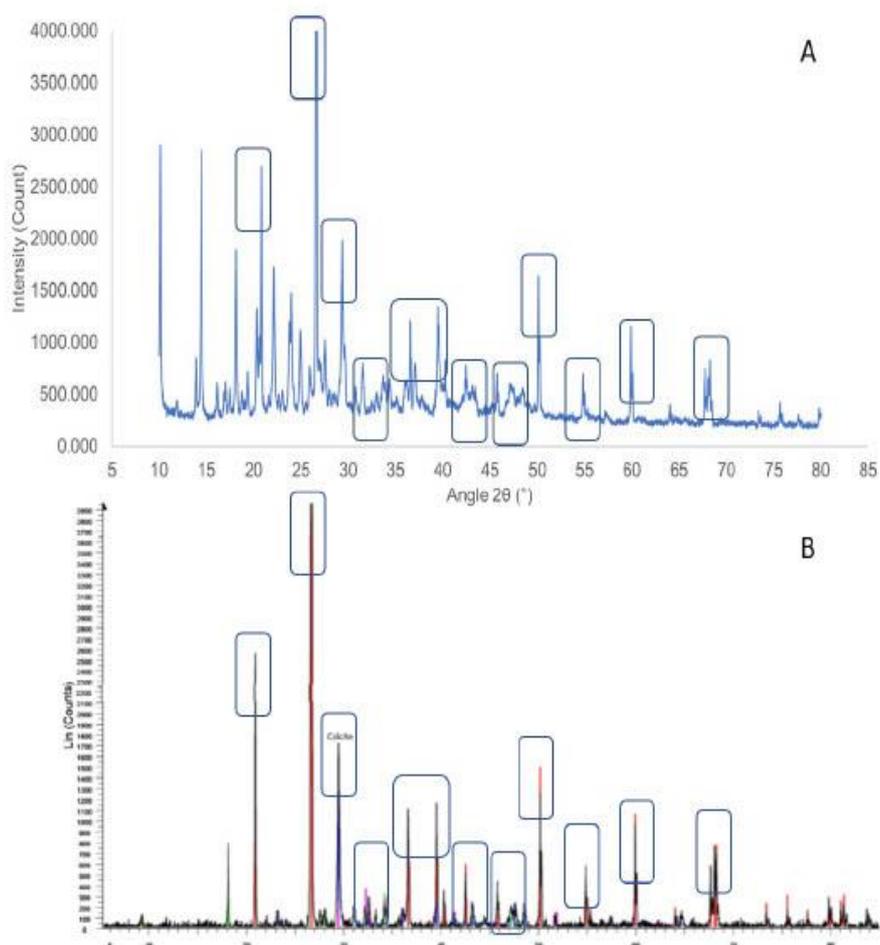


Figure 5: Peaks distribution of crystal formed in: A) biocement produced by *B. cereus*, and B) bioconcrete (Lucas et al., 2018).

It is clear that the Figure 5A showed more residues than the Figure 5B, and it can be explained by the possible crystallization of other components inside the biocement.

102

It is important to emphasize that tests with the biocement are only a screening of CaCO_3 production. It means that the bacterium *Bacillus cereus* has the biotechnological potential to produce calcium carbonate, however it is necessary to test others factors as the resistance to compression, traction, and bending. Furthermore, the material properties should also be evaluated.

4. Conclusions

The biocement produced by the bacterium *Bacillus cereus* has presented a biotechnological potential to produce crystals of calcium carbonate through the biomineralization under the biomechanism of calcium lactate, mainly in the condition of 1.42 g of lactate that represents a cement ratio of 46.7 %. The crystal production should be investigated by the variation of pH from the distilled water, the calcium lactate concentration, the bacterium concentration, and the volume of distilled water added. These combination will build a Central Composite Rotatable Design that is an useful statistical tool.

Tests with Scanning Electron Microscopy should also be done to know the topography of the crystals. Besides the individual investigation between different kinds of cement and *Bacillus* species are essential to understand which bacterium has the best biotechnological potential.

Acknowledgments

This study was conducted with financial support from the research project between the Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI [Advanced institute of Technology and Innovation]) and was developed as part of a thesis to be presented to the Postgraduate Program in Chemical Engineering of the Federal University of Pernambuco (UFPE) with assistance from the team at the Bioengineering Lab of the Catholic University of Pernambuco (UNICAP). The authors are also grateful to the Brazilian fostering agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Coordination for the Advancement of Higher Education Personnel) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq [National Council of Scientific and Technological Development]).

References

- Associação Brasileira De Normas Técnicas, 2018, NBR 16697: *Cimento Portland – Requisitos*, Rio de Janeiro, 12 p.
- Bastrzyk A., Fiedot-Tobola M., Polowczyk I., Legawiec K., Plaza G., 2019, Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 174, 145-152.
- Foust A., Wenzel L., Clump C., Maus L., Andersen L., (2 Ed.), 2013, *Tradution by Horácio Macedo*, LTC, Rio de Janeiro.
- Kaur J., Tripathi S.K., Ankush, Sharma M.D., Kanika, Goyal N., 2017, Rietveld Refinement Study of GeSb_2Te_4 Bulks Prepared Through Distinct Melting Profiles, *Materials Today Proceedings*, 4, 9524-9528.
- Lam C.H.K., Barford J.P., McKay G., 2010, Utilization of Incineration Waste Ash Residues in Portland Cement Clinker, *Chemical Engineering Transactions*, 21, 757-762.
- Lucas S.S., Moxham C., Tziviloglou E., Jonkers H., 2018, Study of self-healing properties in concrete with bacteria encapsulated in expanded clay, *Science and Technology of Materials*, 30, 93-98.
- Mors R.M., Jonkers H.M., 2017, Feasibility of lactate derivative based agent as additive for concrete for regain of crack water tightness by bacterial metabolism, *Industrial Crops and Products*, 106, 97-104.
- Neville A.M. (5 Ed), 2016, *priedades do Concreto*, Bookman, Porto Alegre, BR.
- Ostendorf T., Amaro Da Silva I., Converti A., Sarubbo L.A., 2019, Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater, *Journal of Biotechnology*, 295, 71-79.
- Shanks W., Dunant C.F., Drewniak M.P., Lupton R.C., Serrenho A., Allwood J.M., 2019, How much cement can we do without? Lessons from cement material flows in the UK, *Resources, Conservation & Recycling*, 141, 441-454.
- Sidiq A., Gravina R., Giustozzi F., 2019, Is concrete healing really efficient? A review, *Construction and Building Materials*, 205, 257-273.
- Vijay K., Murmu M., Deo S.V., 2017, Bacteria based self healing concrete – A review, *Construction and Building Materials*, 152, 1008-1014.
- Zhang J., Zhao C., Zhou A., Yang C., Zhao L., Li Z., 2019, 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*, 224, 815-822.
- Zheng C., Liua Z., Xub J., Lia X., Yaoa Y., 2017, Compressive Strength and Microstructure of Activated Carbon-fly Ash Cement Composites, *Chemitrcal Engineering Transactions*, 59, 475-480.

APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO NA BIOINTERFACE RESEARCH IN APPLIED CHEMISTRY (<https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1470914725>)

Biointerface Research in Applied Chemistry
Platinum Open Access Journal (ISSN: 2069-5837)

Review
Volume 11, Issue 6, 2021, 14709 - 14725
<https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1470914725>

Self-Healing Concrete: Background, Development, and Market Prospects

Pedro Pinto Ferreira Brasileiro ¹, Yana Batista Brandão ², Leonie Asfora Sarubbo ³, Mohand Benachour ⁴

¹ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. dos Economistas, s/n, CEP 50740-590, Recife, Brazil; ppfbrasileiro@hotmail.com (P.P.F.B.);

² Unidade Acadêmica do Cabo de Santo Agostinho, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Cabo de Santo Agostinho, Brazil; yanabatista@yahoo.com.br (Y.B.B.);

³ Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, 526, CEP 50050-900, Recife, Brazil and Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Potyra, 31, CEP 50751-310, Recife, Brazil; leonie.sarubbo@unicap.br (L.A.S.);

⁴ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. dos Economistas, s/n, CEP 50740-590, Recife, Brazil; mbena@ufpe.br (M.B.);

* Correspondence: leonie.sarubbo@unicap.br;

Scopus Author ID 6506290276

Received: 28.01.2021; Revised: 8.03.2021; Accepted: 12.03.2021; Published: 31.03.2021

Abstract: The effects of weathering and human activities cause the breakdown of porous structures, such as concrete. Studies have been conducted to address this situation involving the development of self-healing processes that can be employed to seal cracks in concretes in an eco-sustainable manner. This paper addresses the composition and technical norms of concrete, chemical and biological (especially bacteria of the genus *Bacillus*) healing agents, microencapsulation technologies, calcium carbonate biomineralization processes in concrete, the relation between solubility curves and the crystallization process, crystallization mechanisms and methods, microscopic and macroscopic techniques employed for the characterization of self-healing concrete, and state of the art in periodicals and patents. All these topics are essential to establishing planning for the synthesis and/or characterization of self-healing concretes and reductions in the consumption of cement and production of CO₂.

Keywords: healing agents; *Bacillus*; calcium carbonate; solubility curves; crystallization.

© 2021 by the authors. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

One of the hallmarks of urbanization is the mass production of buildings, avenues, bridges, viaducts, and a gamut of constructions that serve as tools to facilitate daily living. However, one of the challenges is the natural formation of cracks in these buildings due to weathering, resulting in drastic and even fatal situations for whoever lives in urban centers. To address this issue, researchers have studied the development of concrete with the capacity for self-healing, mainly with biotechnology's assistance [1].

Ordinary concrete is composed of cement and water as binding agents and a fine and coarse aggregate to ensure rigidity. Cement has various compositions (although it is difficult to find all classifications in the marketplace) and is the most widely consumed mixture globally due to the large quantity of construction projects. Understanding the production and different classifications of cement is key to the establishment of remediating measures. One of the major

problems is the toxicity caused by particulate matter containing silicon dioxide (SiO_2). Therefore, the duality of the high consumption and high toxicity of cement needs to be reconciled [2].

The hydration and drying of cement mixed with fine and coarse aggregate in adequate proportions enable durable concrete formation. However, the effects of weather and human actions cause internal and external cracks in concretes, which require remediating measures. Microorganisms (bacteria and fungi) have been used to adsorb to the interstices of concrete, react with substances such as organic calcium salts, and synthesize compounds such as calcium carbonate to promote the self-healing of cracks in concrete. This phenomenon, known as biomineralization, is found in oysters, as the presence of a parasite in the shell's interior leads to the formation of a pearl [3].

Among the diverse compounds and reactional mechanisms for the self-healing of concrete, calcium lactate is an organic salt that can generate the biomineralization of CaCO_3 with greater safety, as metabolic pathways through other compounds, such as urea and nitrogen compounds, induce the synthesis of nitric acid, which causes corrosion in structures with reinforced concrete [4].

The crystallization of material is also an important aspect in bioconcrete systems for controlling and filling pores. This operation, which is the inverse of solubilization, requires knowledge of the following: the solubility curve of substances (linear or exponential; forward or backward); the temperature for a microbial agent to be used in optimal crystallization conditions; possible polymorphs or pseudo-polymorphs of substances, which affect properties such as strength, solubility, and biological interactions; as well as other advantages [5].

By synthesizing calcium carbonate, microorganisms create crystal structures that fill in pores and cracks resulting from natural and anthropogenic phenomena. The microscopic properties of these crystals can be evaluated using scanning electron microscopy and x-ray diffractometry. Macroscopic evaluations of essential characteristics for synthesizing new types of bioconcrete include the determination of compression, tensile, and flexion strength, setting time, expansibility, and paste consistency, as well as thermogravimetric analysis [6].

The present review addresses these topics, underscoring the importance of biotechnology for the construction of eco-sustainable cities and roads, reducing the synthesis of CO_2 resulting from the mass production of cement, and reducing the exposure of construction workers to the toxic SiO_2 component.

2. Composition of Concrete

Concrete has four basic components: water, cement, fine aggregate, and coarse aggregate (Figure 1). The first two are the most widely used compounds in the world and reflect the binding characteristic of concrete, whereas fine and coarse aggregate are incorporated to enhance the rigidity of the material, with variations found in the shape and proportion of the granules [7].

According to Shanks *et al.* [8], approximately four billion tons of cement are produced per year, which corresponds to the use of 560 kg per person per year. Along with water, this component is essential to the concrete matrix due to the formation of a cement paste to adhere to the components. The cohesion between water and cement is such that hydraulic cement is the term used to denominate all cement that reacts with water and subsequently hardens.

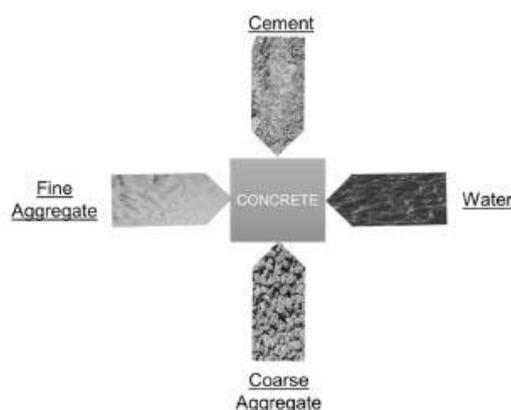


Figure 1. Composition of concrete: cement, water, fine aggregate, and coarse aggregate.

2.1. Cement.

The production of cement as a binding agent begins in a limestone mine. Points of the mine are studied to identify possible locations for the mineral extraction using characterization methods, such as scanning electron microscopy (SEM) and x-ray diffractometry (XRD). These techniques assist in the comparison of the material analyzed to standard crystal profiles. When the material exhibits high similarity with the established standards, the limestone is extracted through explosions in the mine until the rocks are small enough to be transported to a nearby factory on large conveyor belts. A second sampling of the material may be performed in the factory to evaluate whether the mineral has similar quality as that found during the initial SEM and XRD analysis and avoid working with inadequate material. After the mineral's effective extraction, the rocks are stored in silos to be mixed with iron ore and clay (aluminum, iron, and magnesium silicates) and ground into a "flour". The proportion of flour varies depending on the type of cement, as different compositions enable different applications. The flour then goes through a preheating phase denominated pre-calcination, in which heat is applied at a temperature of around 1000°C, which is a little higher than the temperature needed for the breakdown of CaCO_3 into CaO and CO_2 . Some of the different types of clay are refractory materials that can tolerate temperatures of more than 1500°C and can vitrify at around 1300°C. After the major elimination of the gases during pre-calcination, the flour is submitted to heating between 1000 and 1450°C in a continuous rotary kiln, enabling the formation of a mixture denominated clinker. As preheating and heating are the cement industry's main processes, the equipment's maintenance is only performed a few times a year [9].

One of the major environmental problems associated with these types of kilns is the high production of CO_2 , accounting for 5 to 7% of global carbon emissions. The consumption of electrical power alone accounts for 10% of the CO_2 emissions from a cement production process. After the vitrification of the clinker, cooling to room temperature occurs. The entire process is illustrated in Figure 2. These data show that cement fabrication causes an increase in greenhouse gases due to both the reactional process and energy needs [8].

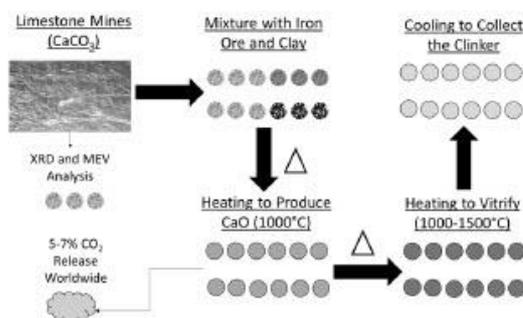


Figure 2. Schematic of clinker production.

After leaving the kiln, the clinker is mixed with different materials: plaster (mainly composed of CaSO₄), which is responsible for the setting time of cement; slag (SiO₂ with other oxides), which is a byproduct of the metal industry; unheated limestone (CaCO₃) powder as a low-cost, sustainable alternative for the industry; pozzolan (rich in silicates), which is highly resistant to corrosion in conditions of high alkalinity; and filler (CaCO₃), which is a fine powder to enhance the workability of cement. Figure 3 lists the materials that form traditional cement. Thus, cement composition includes different types of oxides, especially SiO₂, anions such as carbonate and sulfate, and cations such as calcium, magnesium, iron, and aluminum [7].

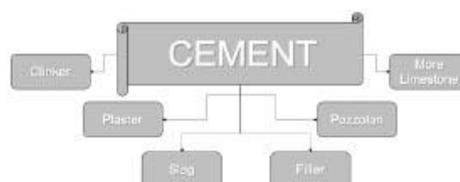


Figure 3. Traditional components of a cement.

The fabrication process is usually directed at the production of Portland cement, which takes its name from the British Isles of Portland. In Brazil, technical norm NBR 16697 unites a set of old norms that specified Portland cement types' composition, describing codes for this specification (Figure 4).

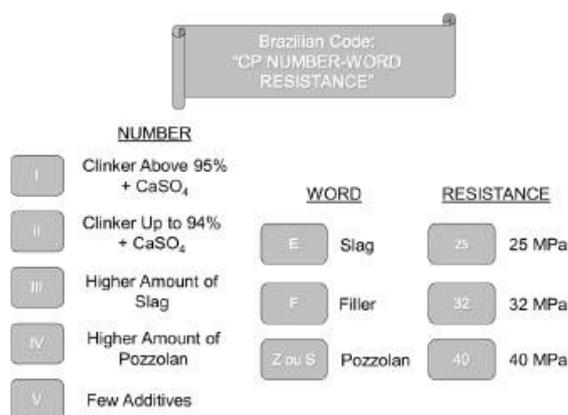


Figure 4. Schematic of brazilian codes for cement production.

The codes are divided into four parts: a) “CP”, which designates the type of cement as Portland; b) type based on composition, such as type I (ordinary), II (compound), III (a blast furnace), IV (pozzolanic) and V (high initial strength); c) additives to the base composition, such as E (blast furnace slag), F (filler) and Z or S (pozzolanic material); and d) resistance in megapascal (MPa) after 28 days when submitted to a minimum compression of 25, 32 or 40 MPa. Thus, CP II-Z 32 means Portland cement composed of pozzolanic material and resistant to a minimum compression of 32 MPa. Subtypes of cement have specific characteristics, as listed below [10]:

- Ordinary cement (CP I): a mixture of at least 95% clinker with one or more calcium sulfate forms (plaster). This cement type is used to slow the setting time and has a variation of pozzolanic additives (CP I-S) to diminish permeability and corrosion.
- Compound cement (CP II): a maximum mixture of clinker with calcium sulfates of up to 94%, with variations in E, F, and Z to have less heat release, greater workability due to the fine filler powder and reduced permeability, respectively.
- Blast furnace cement (CP III): used in works requiring greater strength, such as sewers and dams, with a large amount of slag (silicates).
- Pozzolanic cement (CP IV): greater amount of pozzolans to reduce corrosion and permeability.
- Initial high-strength cement (CP V): practically no additives, with rare exceptions, ensuring greater initial strength on the first day.

2.2. Fine and coarse aggregates.

Fine and coarse aggregates, which are usually sand and gravel, respectively, account for 75% or more of the mass of concrete. Aggregate is an essential factor due to its mechanical and thermal qualities, which influence the concrete's performance, despite not being chemically reactive. The fine aggregate has particles smaller than 4 mm, and the coarse aggregate has particles larger than 5 mm. Grain size is of the utmost importance to the determination of aggregates, as it determines the shape in which the granules can be arranged, affecting characteristics such as porosity, density, and strength. These and other petrographic properties stem mainly from the matrix rock characteristics from which the aggregates were fragmented. Regarding fine aggregate, sand has dimensions between 60 and 70 μm ; the granulometry of silt is between 2 and 60 μm , and clay has smaller dimensions. Gravel is frequently used as coarse aggregate and may be basalt, limestone, gneiss, or granite [2].

The different proportions of cement (C), fine aggregate (FA), and coarse aggregate (CA) determine the trait of the concrete, which can be represented as C:FA:CA”. Thus, a trait of 1:2:3 in mass means that the concrete is one part cement, two parts fine aggregate, and three parts coarse aggregate.

According to Brazilian technical norm NBR 7214, sand used for concrete must be $\geq 95\%$ silica. Considering the previous example with CP III cement (high concentration of silicates), more than half the concrete would be SiO_2 [11].

2.3. Water.

The universal solvent is of the utmost importance in concrete, as it reacts with the cement and causes the hardening of the concrete. Water is so important to the composition of concrete that there is a water/cement ratio, which is the mass of water's division by the mass of

cement used [12]. Small water content in the mixture with cement can reduce the concrete setting time but does not ensure high stability or the ultimate performance that can be achieved. In contrast, high water content increases the setting time and can weaken the concrete [12].

2.4. Types of concrete.

Composed of the two most widely consumed materials globally, concrete has a wide variety of applications and consequently a gamut of types. The following are the main types [2, 9, 13]:

- Conventional: ordinary concrete used in construction.
- Pumpable: used with a higher water/cement ratio when transport via a pump is required.
- Reinforced: conventional concrete in which steel bars are embedded to enhance the mechanical strength but have a greater tendency toward corrosion.
- Prestressed: similar to reinforced concrete, this concrete has spaces designed for the insertion of steel cables, also ensuring greater mechanical strength.
- Sprayed (shotcrete): concrete sprayed through a hose using compressed air.
- Light-weight: concrete with a low specific mass, indicated for finishes.
- Heavy: concrete with a high specific mass designed to avoid radiation.
- Cellular: concrete with a foam additive used in dividing walls.
- Self-healing: concrete that can regenerate itself after suffering cracks.

3. Self-Healing Concretes

The first investigations on self-healing concrete emerged around 1836. In 1956, crystal formation with CaCO_3 was identified. In 1998, researchers were able to recuperate approximately 200 μm of a crack using this type of autogenous cure, considerable advancement in chemical studies on self-healing concrete. This process has the following quality parameters: 1) effective sealing of the crack; 2) compatibility of the formed material with the concrete matrix; 3) long-term strength; 4) multiple improvements in the concrete matrix, and 5) sustainable viability. All these characteristics are fundamental to obtaining concrete with excellent healing capacity. The self-healing of concrete can occur in autogenic and autonomous modes. The autogenic mode regards the cement components' hydration, reacting to form calcium carbonate and, subsequently, filling microcracks in the concrete. This hydration process normally occurs at a pH higher than 7.5. The autonomous mode is strategic self-regeneration that may occur through vascularized systems that enable the percolation of a fluid containing a compound for self-regeneration or a microencapsulation system that releases a compound for self-regeneration the appropriate moment [4, 14].

3.1. Healing agents.

Healing agents may be polymeric, inorganic, or biological. The application depends on technological and financial availability. Dicyclopentadiene and methyl methacrylate are examples of polymeric agents. Sodium silicate and magnesium oxide are examples of inorganic agents, whereas bacteria (especially those of the genus *Bacillus*) and fungi are biological agents. Polymeric and inorganic agents have the disadvantage of reacting chemically in a broad temperature and pH range. These broad ranges are considered disadvantageous because an energy controller is required to stop the chemical reaction. In contrast, bacteria of the genus

Bacillus have an optimum neutral-alkaline pH and exhibit metabolic activity within a narrow temperature range, which varies depending on the species [14].

3.2. Microencapsulation.

Microencapsulation technology works according to the lab-on-a-chip maxim, which is portability for executing a set of functions, in which two phases exist – one dispersed and one continuous. The first phase is where the healing agent (polymeric, biological, or inorganic) is inserted. The second phase is the surrounding reactive capsule responsible for protecting the healing agent, enabling control over the instant in which the capsule is broken, and the self-healing process is initiated [15].

There are two main microencapsulation methods: microfluid droplet generation and cross-linking (Figure 5). The first method works basically with capillary hydraulic systems, such as T-junction, flow focusing, and concurrent flow systems. The input pressures of the system enable the micro-encapsulating of the dispersed phase the continuous phase [15].

The second method is the densification of the continuous phase on the dispersed phase. The continuous liquid phase begins to gel until the occurrence of the protection of the dispersed phase. This method is subdivided into thermal systems, with polymers of different critical solution temperatures; ionic systems, involving the application of sodium alginate for the gelling of the dispersed phase; and photoinduced systems, involving the application of ultraviolet radiation to photoinitiators enveloped by a photomask [16].

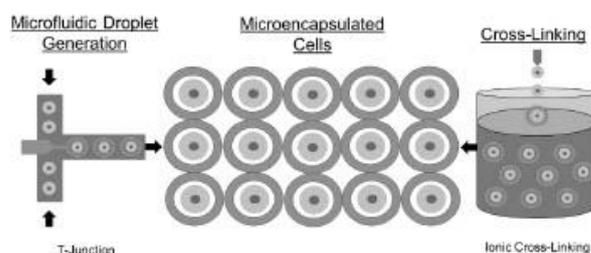


Figure 5. Cellular microencapsulation processes - microfluid droplet generation and cross-linking.

Ionic systems have achieved considerable success in the medical field by integrating 3D printing to create a small vascularized heart through the deposition of cells with sodium alginate in a calcium chloride solution [17].

3.3. Biomineralization.

Some organisms have the capacity for biomineralization, which is transforming organic compounds into inorganic compounds followed by the precipitation of the material. The material can then be employed for a specific purpose. Examples of this phenomenon include the formation of mollusk shells for protection from predators' attacks, the production of a pearl in an oyster as a natural reaction to a parasite's presence, and the precipitation of gold or carbonate by bacteria in a nutritive medium [18].

The bacterial precipitation of calcium carbonate has been studied as an option for the reconstitution of concrete. A bacterium consumes the anion of a dissociated calcium organic salt present in the cement and synthesizes the carbonate anion. This new anion is combined

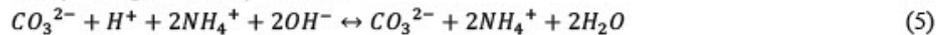
with the calcium cation, forming biomineralized calcium carbonate and reconstituting the concrete's flaws [19].

The pathways for the biomineralization of calcium carbonate by microorganisms and the self-healing of concrete stem basically from three types of chemical reaction: ureolytic, calcium lactate, and denitrifying pathways [4].

The ureolytic pathway consists of the initial transformation of urea into carbonic acid, according to Equations 1 and 2:



In equilibrium, hydroxyl and carbonate anions are formed, leading to an increase in pH, according to Equations 3, 4, and 5:



The major problem with the ureolytic pathway is the transformation of ammonium into nitrogen monoxide, causing environmental pollution, albeit at a lower level compared to common sources of pollution. This pathway can also convert ammonium into nitric acid, thereby increasing the possibility of corrosion.

The calcium lactate pathway (Figure 6) is safer and simpler. This pathway consists of the aerobic oxidation of calcium lactate and combination with calcium hydroxide for the synthesis of calcium carbonate, according to Equations 6 and 7:

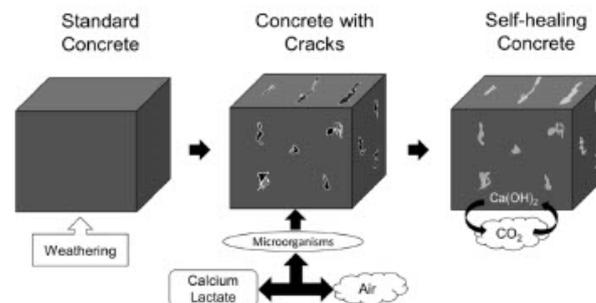
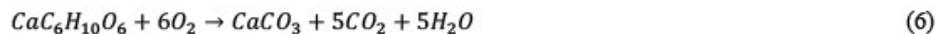
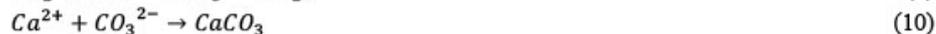
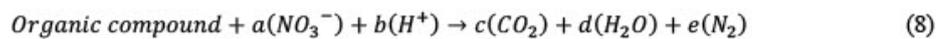


Figure 6. Biominingalization of calcium carbonate by calcium lactate pathway.

The denitrification pathway involves the reduction of nitrate into nitrogen gas and the consequent combination of the formed carbonate with calcium ions, according to Equations 8, 9, and 10:



The hydrolysis of urea is the fastest path for the production of calcium carbonate, but the fastest path is not always the most adequate, considering the problems above related to corrosion and pollution. Likewise, the denitrification pathway increases the possibility of the transformation of nitrate into nitric acid, accelerating reinforced concrete's corrosion. A similarity in the three pathways is the attraction of calcium cations due to the bacterial surface's negative electrical charge [4].

4. Solubility Curves And Crystallization

When placed into a pure solvent, a salt molecule is dissociated into a cation and anion due to intermolecular interactions between the solvent and salt (solute) (Figure 7). As more salt molecules are added to the solvent, more ions are formed until reaching a threshold beyond which the remaining molecules of the solvent no longer have the energy necessary to break the intramolecular bonds of the salt, resulting in the precipitation of the excess salt. Hence, each saline solution has a necessary chemical potential to dissociate the salt occurs [20].

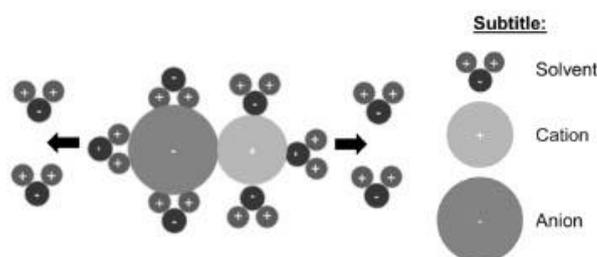


Figure 7. Separation of ions of solute by solvent through intermolecular interactions.

In practice, rather than using chemical potentials, a quantity (in mass) of a given salt is used for a quantity (in volume) of solvent. The salt's solubility limits differ depending on variations in the solute, solvent, pressure, and temperature. Under a single pressure, these limits are graphically represented as a solubility curve comprising the ratio between the quantity (in mass) of a given solute per 100 units (in volume) of the solvent, varying with temperature. Solubility curves can have profiles with linear or exponential variations and with solubility directly (more frequent) or inversely (rarer) proportional to the variation in temperature. The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) offers a set of more than 100 volumes with solubility tables and curves to help researchers find the most adequate, most reliable solubility for solutions. The solubility curve assists in making the ideal choice to enable the recovery of the solute and/or solvent through an operation denominated crystallization, which is the inverse of solubilization and enables the formation of ordered arrangements of molecules in a repetitive matrix (crystals) [20, 21].

The importance of solubility curves to crystallization is exemplified in Figure 8, which displays the solubility curve and metastable limit for any solute and solvent. Below the solubility curve is the unsaturation zone, where the maximum stable degree of dissolution of a component has not yet been reached. Above the solubility curve is a region denominated the supersaturation zone, where the solvent can accommodate a larger quantity of the solute than the limit established by the solubility curve, but in an unstable manner, through a difference in chemical potentials at a fixed temperature. The supersaturation zone is subdivided into a metastable zone and a labile zone through the metastable limit. If linear or with a decreasing

exponential function, this solubility curve profile will completely change the metastable limit profile and, consequently, change the mechanisms and methods for the occurrence of crystallization [22].

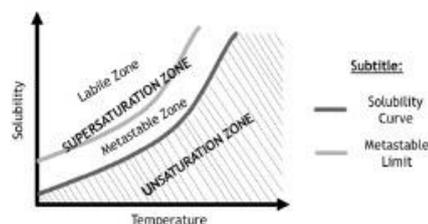


Figure 8. Representation of unsaturation and supersaturation zones with solubility curve and a metastable limit for any solute and solvent.

When the binary mixture (solute and solvent) is in the labile zone, there is extreme instability in the degree of dissolution of this component, and any collision, such as small particulate matter, is sufficient to induce crystallization through a mechanism known as nucleation. A practical example is when water vapor changes from a gaseous state into a solid-state through inverse sublimation or resublimation when striking grains of dust in the air, giving rise to hexagonal snowflakes [22].

In nucleation (Figure 9), as some ions dissolved in the solvent (growth units) in the labile zone perform intermolecular interactions, an unstable entity is formed denominated a cluster. This cluster is unstable because it can break apart again depending on the energy conditions. However, if the cluster keeps growing until reaching a critical size, there is the formation of a stable entity (nucleus). The addition of ions to the nucleus has denominated a crystal. This nucleation mechanism is primary because the nucleus is formed by developing a single cluster but can be secondary with the agglomeration of distinct clusters. Another mechanism of crystallization is crystal growth. This occurs when the formed nuclei are in the metastable region and increase in size with ions' adsorption due to the continued energy instability (difference in chemical potentials) [5, 23].

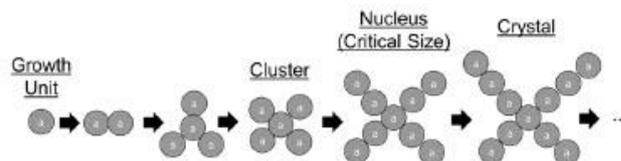


Figure 9. Theory of primary nucleation of a crystal.

A substance may have one or more forms of molecule arrangements upon crystallizing and therefore may present a polymorphism. This phenomenon occurs because it is common in nature for equilibrium to be reached with lower energy consumption, considering the environment in which the solute and solvent are found. In an industrial process, polymorphs can be formed under different operating conditions, such as variations in temperature and pressure (altering the mechanical, physicochemical, and thermal properties), as well as biological interactions. Ammonium nitrate is often used as a fertilizer, but the two nitrogen atoms in this molecule have a variation in the oxidation number between -3 and +5, which are the minimum and maximum oxidative states permitted for the nitrogen group in the periodic table. In the presence of heat, an auto-redox reaction abruptly releases a quantity of energy,

characterizing an explosion. Thus, the polymorphism can transform a fertilizer substance into an explosive [24].

As an example of a physicochemical property, solubility is strongly influenced by the morphology of the crystal. Therefore, a substance can have different solubilities depending on the polymorphism. More stable polymorphs have less solubility. For crystals' obtainment in cooling and heating processes, water molecules can adhere to the molecules of the crystal, forming inclusions, but these hydrated compounds are not the same isolated molecules and are therefore denominated pseudo polymorphs [5].

Calcium carbonate can exhibit three distinct crystalline forms and has a reverse solubility curve (solubility diminishes with the increase in temperature). At a fixed temperature and pressure, the crystalline forms (in increasing order of solubility) are calcite (found in limestone mines), aragonite (found in karstic caverns and the exoskeletons of animals), and vaterite (found in gall stones and kidney stones). Due to its lower solubility, calcite is the most stable and most common form of calcium carbonate crystallization [25].

Methods for the crystallization of compounds vary depending on the solubility curve. Crystals can be formed in the following ways: I) cooling, when the solubility of the solute is directly proportional to temperature, avoiding the use of heat exchangers and the occurrence of fouling; II) evaporation as occurs in saline for the production of NaCl, when the solute varies little with the change in temperature; III) melting, when a solid contains two or more substances and the separation of one is needed through distinct points of fusion; IV) precipitation by an antisolvent, in which the solubility of a solute is reduced with the formation of a mixed solvent; V) precipitation by a chemical reaction, in which the synthesis of a product with low solubility occurs; and other methods [5].

In the case of the precipitation of calcium carbonate induced by microorganisms, the concrete or solidified cement exhibits porous fractures that can be filled with solutions containing lactate and/or microorganisms or microbial spores and/or gaseous systems containing air or O₂. This triphasic system has two main phenomena: biochemical reactions and crystallization, depending on each crystallizing model. The measurement of the reaction and crystallization rates results in the limiting velocity of the process, enabling knowledge of the conditions necessary for the control of the process, especially in synthesizing the three polymorphs of CaCO₃. Bacteria of the genus *Bacillus* have the advantage of having a negatively charged cell wall, which attracts Ca²⁺ cations or undissolved calcium lactate molecules. When this complex adheres to the surface with crystalline nuclei formation, the crystallization of calcium carbonate occurs through biomineralization [26].

Some microorganisms used in the crystallization process also have the biotechnological potential for the synthesis of natural surfactants (biosurfactants), which can assist in the self-healing of concrete through the use of bacteria and fungi, as the biosurfactants enable the microorganisms to penetrate the pores of the concrete with greater ease by lowering the surface tension. Biosurfactants promote an increase in the humectation (capillarity) of the fluid, facilitating the penetration of bacteria and fungi into the narrower pores of the concrete, and promote the crystallization of microcracks; the low toxicity of these natural surfactants also ensures the viability of the microorganisms [27]. Durval *et al.* [28] confirmed the low toxicity of biosurfactants produced by *Bacillus cereus* strain. Thus, microorganisms can serve as both healing agents and producers of biosurfactants to improve the crystallization process.

5. Characterization of Self-Healing Concrete

The entire process has standardized quality parameters to ensure reproducibility and determine possible continual improvement and the consequent development of the procedure from the artisanal realm to the technoscientific realm. The biomineralization of calcium carbonate in concrete through the calcium lactate pathway can be characterized using assays addressing the cement and concrete's macroscopic properties and the microscopic properties of the product formed by the healing agent in the concrete matrix. The following are analyses of the macroscopic properties of cement that can be performed:

a) Normal paste consistency: technique stipulated in Brazil by technical norm NBR 16606 regarding the penetration depth of a probe into cement paste; the Vicat apparatus is used for this analysis [29].

b) Setting time: technique stipulated in Brazil by technical norm NBR 16607 regarding the hardening of a cement paste; the Vicat apparatus is also used for this analysis [30].

c) Expansibility: technique stipulated in Brazil by technical norm NBR 11582 indicating the variation in cement volume. High expansibility is normally not required due to the rigid cement paste's possible rupture; the Le Chatelier apparatus is used for this analysis [31].

The addition of fine and coarse aggregate enables analyzing the macroscopic properties of concrete. Cylindrical or prismatic molds are needed for experiments with test specimens, following Brazilian technical norm NBR 5738:2015, 2016 revised version [32]. The following are examples of concrete strength tests [2]:

a) Simple compression: a test of the reduction in volume in the presence of two opposing axial forces.

b) Simple tensile: a test of the increase in volume in the presence of two opposing axial forces.

c) Flexion: test in the presence of a force orthogonally applied to the center of mass of the test specimen.

Other macroscopic tests include the following:

a) Permeability: capacity of concrete to retain a liquid, generally water [33].

b) Thermogravimetric analysis (TGA): method in which a solid is heated at a particular constant rate until reaching a particular temperature for the determination of the loss of mass and degree of degradation [34].

Tests of microscopic properties are also important to identify what probable components are being studied and determining the petrographic characteristics of a material. The following methods can be used for studying bioconcrete [6, 34]:

(a) Scanning electron microscopy (SEM): the use of three-dimensional topographic profiles to examine the material's crystallinity; SEM is not a complete quantitative measure due to the different types of images but is a widely employed tool for the visualization of microscopic abnormalities

(b) X-ray diffraction (XRD): a crystallographic technique in which a known x-ray beam is applied to a sample at a particular angle, causing diffraction of the beam. The standard deviation of the rays corresponds to the variation in electron density in the crystal, enabling the determination of a crystallographic profile and identifying possible constituents.

SEM responses are data that can be interpreted through the comparison of photographs. In contrast, XRD requires comparing crystallographic profiles found in databanks with distinct profiles from different world regions. HighScore Plus® from PANalytical B.V.© is one of the

software programs used for profile analysis, enabling the importation of the crystallographic profile obtained from a diffractometer, the comparison of the profile to an integrated data bank, listing possible compatibilities with the diffractogram and compatibility percentages, and the editing of the probable components for the material in question. Therefore, this software program is an essential tool for XRD analysis [35].

6. Patents of Self-Healing Concrete and Similar Systems

For a company, the registration of intellectual property regards an intangible product of the human mind. Patents protect the ideas of inventors, and an investigation of patent records reveals the market aspects of different types of processes [36].

Regarding self-healing concretes, methods and inventions are found in the Netherlands, the USA, South Korea, China, and Japan. Thus, a large portion of such patents is found in Asia.

Song *et al.* [37] proposed a system in series to recycle solutions containing healing agents in concrete cylinders partitioned axially. The aim was to compare the solid medium's permeability and the healing agent's sealing potential, as a less permeable medium would denote greater self-regeneration. In this system, a solution percolates through a cylinder and promotes the concrete's self-healing in accordance with the level of pressure of the solution in the cylinder.

Shin *et al.* [38] devised sealing not by immersion in a solution but through a diffusion process of gases applied orthogonally to a concrete block. The test specimen had a crack through which the gases could penetrate and promote the concrete regeneration process. Concrete blocks can be bio-regenerated by the sealing mechanism with calcium lactation through the concrete's oxygen gas diffusion.

Jonkers [39] report that some genera of bacteria are preferable for the self-healing of concretes, such as *Planococcus*, *Bacillus*, and *Sporosarcina*, especially *Bacillus*. In this patent, the inventor indicates mass ratios between 1) the bacterial material and healing agent in the range of 1:10000 to 1:1000000, with the cellular material dry and in well-divided proportions, and 2) the healing agent and cement in the range of 1:20 to 1:2000, preferably 1:50 to 1:500 (including water).

Wiktor and Jonkers [40] proposed a method for conditioning concrete to bacterial action for self-healing through a mixture of two liquids: a healing agent and a gelling agent. This mixture promotes the self-healing of concrete, mainly on inclined surfaces or ceilings, where the weight force of a more fluid liquid impedes it from staying in place. For example, sodium silicate (gelling agent) and a calcium salt (healing agent), such as calcium nitrate, could be used. The authors suggest applying the healing agent 30 minutes after the application of the gelling agent.

Li *et al.* [41] suggest implementing concrete containing calcium lactate salts and perlite granules to protect basophilic organisms, such as *Bacillus cereus*, from unfavorable environmental conditions. According to the inventors, *Bacillus cereus* in the dormant state in a dry environment can remain viable for up to 50 years.

Keung *et al.* [42] created a method for forming microcapsules with the capacity to promote the self-healing of concrete. This development involved the initial mixture of surfactants (polyethylene glycol dioleate, sorbitan laurate, polyethylene glycol isostearate, and others), healing agents (such as colloidal silica), and encapsulating polymers (such as polyurethane and polystyrene). The mixture was homogenized at a low, stirring speed (50 to 600 rpm) for the formation of an emulsion and then at high speed (1000 to 12000 rpm) in the

presence of catalysts, such as bismuth carboxylate, zinc carboxylate, and mercaptide oxides. The change in speed was necessary for the initial emulsification and the consequent formation of larger silica droplets. The high stirring speeds in the emulsification process reduced the colloidal silica droplets' size, causing phase separation.

7. Self-Healing Concretes and Similar Systems in Periodicals

Reddy *et al.* [43] address a set of chemical healing agents, such as crystalline mixtures, polymers, and fibers, for concrete self-healing. The authors also report the thickness of crystalline recovery and the type of exposure to environmental conditions (dry or wet).

Reddy *et al.* [44] offer an excellent compilation of four types of bacteria of the genus *Bacillus* (*megaterium*, *pasteurii*, *sphaericus*, and *subtilis*) from diverse bibliographic sources for application in self-healing concrete, indicating where the bacteria are found, cell concentration ranges in the medium, the common working temperature for the bacteria, and the encapsulation material. The authors also compare the strength of the concrete considering different bacterial concentrations.

Martuscelli *et al.* [45] evaluated the biotechnological potential of 19 species of fungi grown in Petri dishes with a urea medium (20 g/L) for six days, identifying strains of *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium angustihherbarum*, and *Penicillium brevicompactum* as having ureolytic activity based on the strong change in color.

Rauf *et al.* [46] submitted sporulated strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cohnii*, and *Bacillus sphaericus* to different media containing urea (0.0 to 2.8%, m/m of cement) and calcium lactate (1.2 to 4.0%, m/m of cement) for 28 days. The authors evaluated the thickness of the concrete seal, diffractograms of the self-healed concretes, and compression strength, reporting the following results: the maximum thickness of 0.8 mm; diffractograms containing calcite and aragonite as polymorphs of calcium carbonate; and maximum compression strength of 42 MPa. *B. sphaericus* demonstrated the best efficiency regarding the recovery of concrete.

Zhang *et al.* [3] pre-inoculated a strain of *Bacillus cohnii* and two microorganism colonies under anoxic and anaerobic conditions in a medium containing calcium lactate (8 g/L). The solutions were placed in devices for the simultaneous testing of the concrete's permeability and its regeneration by CaCO₃ in 28-day experiments. XRD analysis was also performed. The researchers found maximum calcification of 1.22 mm under anoxic conditions of the colonies after the study period. Moreover, permeability in water presence was reduced by incorporating calcium salts into the concrete structure. Under these conditions, calcite and aragonite (both crystals of CaCO₃) were found in the diffractograms.

Brasileiro *et al.* [47] added calcium lactate (2.8 to 6.6%, w/w of cement) to the composition of cement, hydrating and solidifying the mixture in 15-cm Petri dishes, followed immediately by the inoculation of 1 mL of a medium containing *Bacillus cereus* (10⁷ cells/mL). The authors observed crystal growth on the cement's surface (Figure 10) for seven days and performed XRD analysis. The two main results were nucleations formed after about 17 h and peaks in the sample's diffractogram, revealing an initial 6.6% calcium lactate, corresponding to 82% SiO₂ and 18% CaCO₃ (calcite).

8. Conclusions

This paper discussed the main aspects of the synthesis of self-healing concrete, from the initial production of cement to the patenting of solutions.

Regarding cement production, we identified the main components that need to be addressed in novel methods to replace toxic agents, such as SiO_2 , and the suggestion of novel reactional and bioreaction mechanisms for the sealing of cracks in traditional concrete. Moreover, it is important to know the technical norms that govern the production process so that all mechanisms are proposed, preferably following such norms or so that a technical norm commission can be formed to effectuate changes.

Regarding microencapsulation technologies, we discussed the types of healing agents and ways to store these agents for future applications and the adequate bioreactional mechanisms for the effective self-healing of concrete over time without weakening the system.

In terms of crystallization, we addressed the importance of knowledge on each substance's solubility curve and each polymorph of each substance, and we point out the existence of pseudo polymorphs. The solubility curve of a substance enables testing the adequate crystallization methods for a process and adapting novel crystallization methods to the microorganism, type of cement, and bioreaction process.

In evaluating self-healing concrete properties, we identified the routine methods used for both macroscopic and microscopic analyses to indicate competitiveness with traditional concrete production processes.

One of the challenges of biotechnology is its incorporation into traditional production processes in the industry to achieve improvements in the process, such as optimizing the properties of a material and/or a reduction in the toxicity of compounds employed in the process. Meeting this challenge requires an adequate theoretical basis encompassing market aspects through records of intellectual property and scientific aspects found in international periodicals and books. Therefore, the production of self-healing concrete is a challenge to be met with biotechnology.

Funding

This research was funded by Postgraduate Program in Chemical Engineering of the Center for Technology and Geosciences of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), the Brazilian fostering agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES (Coordination for the Advancement of Higher Education Personnel - Finance Code 001), Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI [Advanced Institute of Technology and Innovation]) and Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP).

Acknowledgments

The authors are grateful to the Postgraduate Program in Chemical Engineering of the Center for Technology and Geosciences of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), the Brazilian fostering agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES (Coordination for the Advancement of Higher Education Personnel), Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI [Advanced Institute of Technology and Innovation]) and Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) for the financial, technical, academic, and scientific resources.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Nain, N.; Surabhi, R.; Yathish, N.V.; Krishnamurthy, V.; Deepa, T.; Tharannum, S. Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria. *Constr. Build. Mater.* **2019**, *202*, 904-908, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.01.059>.
- Neville, A.M. *Propriedades do Concreto*. 5th ed. Bookman: Porto Alegre, Brazil, **2016**.
- Zhang, J.; Zhao, C.; Zhou, A.; Yang, C.; Zao, L.; Li, Z. Aragonite formation induced by open cultures of microbial consortia to heal cracks in concrete: Insights into healing mechanisms and crystal polymorphs. *Constr. Build. Mater.* **2019**, *224*, 815-822, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.07.129>.
- Sidiq, A.; Gravina, R.; Giustozzi, F. Is concrete healing really efficient? A review. *Constr. Build. Mater.* **2019**, *205*, 257-273, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.02.002>.
- Guardani, R.; Seckler, M.M.; Giulietti, M. *Cristalização De Produtos Biotecnológicos*. 2nd ed.; Kilkian, B.V., Pessoa Júnior, A., Eds., Blucher: São Paulo, Brazil, **2020**.
- Mors, R.M.; Jonkers, H.M. Feasibility of lactate derivative based agent as additive for concrete for regain of crack water tightness by bacterial metabolism. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *106*, 97-104, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.037>.
- Brito, J.; Kurda, R. The past and future of sustainable concrete: A critical review and new strategies on cement-based materials. *J. Clean. Prod.* **2020**, *281*, 1-72, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123558>.
- Shanks, W.; Dunant, C.F.; Drewniok, M.P.; Lupton, R.C.; Serrenho, A.; Allwood, J.M. How much cement can we do without? Lessons from cement material flows in the UK. *Resour. Conserv. Recy.* **2019**, *141*, 441-454, <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.11.002>.
- Singh, G.V.P.B.; Subramaniam, K.V.L. Production and characterization of low-energy Portland composite cement from post-industrial waste. *J. Clean. Prod.* **2019**, *239*, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118024>.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas. *NBR 16697: Cimento Portland – Requisitos*. Rio de Janeiro, **2018a**; pp. 12.
- Associação Brasileira De Normas Técnicas. *NBR 7214: Areia normal para ensaio de cimento – Especificação*. Rio de Janeiro, **2015**; pp. 4.
- Hover, K.C. The influence of water on the performance of concrete. *Constr. Build. Mater.* **2011**, *25*, 3003-3013, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.01.010>.
- Chica, L.; Alzate, A. Cellular concrete review: New trends for application in construction. *Constr. Build. Mater.* **2019**, *200*, 637-647, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.12.136>.
- Danish, A.; Mosaberpanah, M.A.; Salim, M.U. Past and present techniques of self-healing in cementitious materials: A critical review on efficiency of implemented treatments. *J. Mater. Res. Technol.* **2020**, *9*, 6883-6899, <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.053>.
- Kanellopoulos, A.; Giannaros, P.; Palmer, D.; Kerr, A.; Al-Tabbaa, A. Polymeric microcapsules with switchable mechanical properties for self-healing concrete: synthesis, characterisation and proof of concept. *Adv. Mater. Res-Switz.* **2017**, *26*, 1-16, <http://dx.doi.org/10.1088/1361-665X/aa516c>.
- Alkayyali, T.; Cameron, T.; Haltli, B.; Kerr, R.; Ahmadi, A. Microfluidic and cross-linking methods for encapsulation of living cells and bacteria - A review. *Anal. Chim. Acta.* **2019**, *1053*, 1-21, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.056>.
- Noor, N.; Shapira, A.; Edri, R.; Gal, I.; Wertheim, L.; Dvir, T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1-10, <https://doi.org/10.1002/advsc.201900344>.
- Bastrzyk, A.; Fiedot-Tobola, M.; Polowczyk, I.; Legawiec, K.; Plaza, G. Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. *Colloid. Surface. B.* **2019**, *174*, 145-152, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.009>.
- Vijay, K.; Murmu, M.; Deo, S.V. Bacteria based self healing concrete – A review. *Constr. Build. Mater.* **2017**, *152*, 1008-1024, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.07.040>.
- Genck, W.J.; Albin, B.; Baczek, F.A.; Dickey, D.S.; Gilbert, C.G.; Herrera, T.; Laros, T.J.; Li, W.; Mccurdie, P.; McGillicuddy, J.K.; McNulty, T.P.; Moyers, C.G.; Schoenbrunn, F.; Wisdom, T.W.; Chen, W. *Liquid-Solid Operations And Equipment. Perry's Chemical Engineer's Handbook*. 9th ed.; Green, D.W. (Eds.), Southard, M.Z.; McGrawHill Education: New York, United States of America, **2019**.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Solubility Data. Series. Available online: <https://iupac.org/what-we-do/databases/solubility-data-series/> (Accessed on 13 September 2020).
- Foust, A.; Wenzel, L.; Clump, C.; Maus, L.; Andersen, L. *Princípios das Operações Unitárias, tradução by Horácio Macedo*. 2nd ed.; LTC: Rio de Janeiro, Brazil, **2013**.
- Mullin, J.W. *Crystallization*. 4th ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, England, **2001**.
- Oxley, J.C.; Smith, J.L.; Rogers, E.; Yu, M. Ammonium nitrate: thermal stability and explosivity modifiers. *Thermochim. Acta.* **2002**, *384*, 23-45, [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00775-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00775-4).
- Chen, J.; Xiang, L. Controllable synthesis of calcium carbonate polymorphs at different temperatures. *Powder Technol.* **2009**, *189*, 64-69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2008.06.004>.
- Lucas, S.S.; Moxham, C.; Tziviloglou, E.; Jonkers, H. Study of self-healing properties in concrete with bacteria encapsulated in expanded clay. *Sci. Technol. Mater.* **2018**, *30*, 93-98, <https://doi.org/10.1016/j.stmat.2018.11.006>.

27. Daltin, D. *Tensoativos: Química, propriedades e aplicações*. 1st ed.; Blucher: São Paulo, Brazil, 2011.
28. Durval, J.J.B.; Mendonça, A.H.R.; Rocha, I.V.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *157*, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>.
29. Associação Brasileira De Normas Técnicas. *NBR 16606: Cimento Portland — Determinação da pasta de consistência normal*. Rio de Janeiro, 2018b, pp. 8.
30. Associação Brasileira De Normas Técnicas. *NBR 16607: Cimento Portland — Determinação dos tempos de pega*. Rio de Janeiro, 2018c, pp. 4.
31. Associação Brasileira De Normas Técnicas. *NBR 11582: Cimento Portland - Determinação da expansibilidade Le Chatelier*. Rio de Janeiro, 2016a, pp. 4.
32. Associação Brasileira De Normas Técnicas. *NBR 5738: Concreto - Procedimento para moldagem e cura de corpos de prova*. Rio de Janeiro, 2016b, pp. 9.
33. Mengel, L.; Krauss, H.; Lowke, D. Water transport through cracks in plain and reinforced concrete – Influencing factors and open questions. *Constr. Build. Mater.* **2020**, *254*, 1-12, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118990>.
34. Pindelska, E.; Sokal, A.; Kolodziejski, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2017**, *117*, 111-146, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.014>.
35. Kaur, J.; Tripathi, S.K.; Ankush; Sharma, M.D.; Kanika; Goyal, N. Rietveld Refinement Study of GeSb₂Te₄ Bulks Prepared Through Distinct Melting Profiles. *Mater. Today-Proc.* **2017**, *4*, 9524-9528, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.217>.
36. Chagas, E.E. *Direito Empresarial*. 5th ed.; Saraiva Educação: São Paulo, Brazil, 2018.
37. Song, T.; Lee, S.; Park, J. Permeability Test Method and Apparatus for Self Healing Concrete. Depositor: Korea Institute of Construction Technology. KR n° 101453312B1. Filled: 14 March 2014. Granted: 22 October 2014.
38. Shin, S.J.; Lee, D.G.; Lim, M.; Lee, G. Gas diffusion test apparatus and test method for test evaluation of crack width and self-healing performance of crack specimen. Depositors: Chungnam National University Industry-Academic Cooperation Foundation; Sungkyunkwan University Industry-Academic Cooperation Foundation. KR n° 102105840B1. Filled: 16 November 2018. Granted: 29 April 2020.
39. Jonkers, H.M. Healing agent for self-healing cementitious materials. Depositor: Technische Universiteit Delft. NL n° 2004520C2. Filled: 07 April 2010. Granted: 11 October 2011.
40. Wiktor, V.A.C.; Jonkers, H.M. Bio-based repair method for concrete. Depositors: Technische Universiteit Delft and Stichting voor de Technische Wetenschappen te Utrecht. NL n° 2010818C2. Filled: 17 May 2013. Granted: 24 November 2014.
41. Li, Z.; Zhang, J.; Zhao, L. Crack self-repairing concrete using aerobic and alkaliphilic microorganisms and preparation method thereof. Depositor: Taiyuan University of Technology. CN n° 106045400A. Filled: 03 June 2016. Granted: 09 March 2018.
42. Keung, L.H.; Tan, N.P.B.; Choi, W.H.; Lam, W.C. Self-Healing Material And Preparation Process Thereof. Depositors: Nano and Advanced Materials Institute Limited. US n° 9598313B2. Filled: 28 June 2015. Granted: 21 March 2017.
43. Reddy, P.V.Y.; Ramesh, B.; Macrin, D. Effect of crystalline admixtures, polymers and fibers on self healing concrete - a review. *Mater. Today-Proc.* **2020a**, *33*, 763-770, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.122>.
44. Reddy, P.V.Y.; Ramesh, B.; Kumar, L.P. Influence of bacteria in self healing of concrete - a review. *Mater. Today-Proc.* **2020b**, *33*, 4212-4218, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.07.233>.
45. Martuscelli, C.; Soares, C.; Camões, A.; Lima, N. Potential of Fungi for Concrete Repair. *Proc. Manuf.* **2020**, *46*, 180-185, <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.03.027>.
46. Rauf, M.; Khaliq, W.; Khushnood, R.A.; Ahmed, I. Comparative performance of different bacteria immobilized in natural fibers for self-healing in concrete. *Constr. Build. Mater.* **2020**, *258*, 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119578>.
47. Brasileiro, P.P.F.; Soares da Silva, R.C.F.; Rocha e Silva, F.C.; Brandão, Y.B.; Sarubbo, L.A.; Benachour, M. Biomining of Calcium Carbonate by *Bacillus Cereus* for Self-healing Biocement. *Chem. Engineer. Trans.* **2020**, *79*, 97-102, <https://doi.org/10.3303/CET2079017>.



Article

Cascade System for Biomineralization in Cement: Project, Construction and Operationalization to Enhance Building Energy Efficiency

Pedro Pinto Ferreira Brasileiro ^{1,2}, Bruno Augusto Cabral Roque ^{1,2}, Yana Batista Brandão ^{2,3},
Alessandro Alberto Casazza ^{4,*}, Attilio Converti ⁴, Mohand Benachour ^{1,2} and Leonie Asfora Sarubbo ^{1,2,5}

- ¹ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Av. dos Economistas, s/n, CEP, Recife 50740-590, Brazil; pppbrasilero@hotmail.com (P.P.F.B.); brunoaugusto933@hotmail.com (B.A.C.R.); mohand.benachour@ufpe.br (M.B.); leonie.sarubbo@unicap.br (L.A.S.)
- ² Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação, Rua Potyra, 31, CEP, Recife 50751-310, Brazil; yanabatista@yahoo.com.br
- ³ Unidade Acadêmica do Cabo de Santo Agostinho, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP, Cabo de Santo Agostinho 54518-430, Brazil
- ⁴ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genoa (UNIGE), I-16145 Genoa, Italy; converti@unige.it
- ⁵ Escola Icam Tech, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, CEP, Recife 50050-900, Brazil
- * Correspondence: alessandro.casazza@unige.it



Citation: Ferreira Brasileiro, P.P.; Cabral Roque, B.A.; Batista Brandão, Y.; Casazza, A.A.; Converti, A.; Benachour, M.; Asfora Sarubbo, L. Cascade System for Biomineralization in Cement: Project, Construction and Operationalization to Enhance Building Energy Efficiency. *Energies* 2022, 15, 5262. <https://doi.org/10.3390/en15145262>

Academic Editor: F. Pacheco Torgal

Received: 13 June 2022

Accepted: 18 July 2022

Published: 20 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Anthropogenic and natural actions cause internal and external fractures in concrete. To recover these structures, bio-concretes have been developed with bacteria of the genus *Bacillus*. These microorganisms consume calcium lactate, synthesize calcium carbonate and biomineralize CaCO₃ crystals within the structures of concrete. The aim of the present study was to construct equipment, denominated “Cascade System for Biomineralization in Cement” (CSBC), to determine the limiting velocity of the biomineralization of CaCO₃. The construction of the equipment took into consideration chemical and biochemical phenomena responsible for biomineralization. Parts made with 3D printing and a circuit with Arduino UNO R3 board were used in the assembly of the system. The prototype proved to be stable and can be considered a promising tool for future application in research of the regeneration of reinforced concrete in a practical, fast and economical way, especially to the energy sector.

Keywords: *Bacillus*; calcium carbonate; limiting velocity; 3D printing; Arduino UNO R3

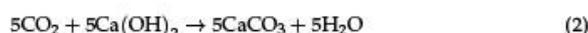
1. Introduction

Cement is the most widely used material throughout the world due to the continual need for construction to meet the demands of globalization. When water is added to cement, a chemical reaction occurs, forming hydrated cement, which is combined with fine and coarse aggregate to form concrete [1]. Rain, wind, solar radiation and lexiviation cause considerable surface and structural wear in concrete. Internal and external fractures can alter macroscopic aspects, such as tensile, compressive and flexion strength, as well as the porosity, of concrete. Such harm can render a building unviable, mainly due to safety reasons [2].

The recovery of these structures normally occurs by means of so-called healing agents, which internally regenerate the worn pores. Such healing agents may be chemical or biochemical. Chemical agents include the compounds magnesium oxide, sodium silicate and methyl methacrylate. Among biochemical agents, bacteria of the genus *Bacillus* predominate, but some species of yeast are also used. The main advantage of a biochemical agent is the capacity of bacteria and yeasts to reproduce, with biotechnological healing potential [3].

The bioprocess by which bacteria are capable of transforming an organic compound into an inorganic one is called biomineralization. This phenomenon is common as a defense mechanism found in crustaceans, such as the production of an exoskeleton or the transformation of a parasite into a pearl [4].

Calcium carbonate production is one of the aims of biomineralization for concrete healing, which can occur through the following three main metabolic pathways: (I) ureolytic, (II) denitrification and (III) calcium lactate. The first two pathways have the disadvantage of producing nitrogenated compounds as byproducts, which acidify concrete and can damage civil engineering structures [5]. Therefore, the lactate pathway is the most suitable, as it does not produce nitrogen compounds, as shown in the equations:



The use of chemical and biochemical systems (bio-mineralizers) in the self-regeneration of concrete has been described. There are pressurized liquid or gaseous systems with curing agents in the concrete, systems with gelling agents to be mixed with curing bioagents and systems with the use of surfactants to favor percolation in the concrete. As regards lifetime, bacteria can be inactivated for 50 years until the need for self-regeneration of concrete through microencapsulation [6]. However, none of these systems is intended to determine the rate-limiting process, between crystallization and chemical or biochemical reaction, which occurs simultaneously. Therefore, a prototype that allows identification of the rate which is the limiting rate is essential.

A component of cement that has antibacterial activity is iron ore, but as cement has different kinds of components the mixture can either accelerate bacterial viability (synergistic effect) or can reduce bacterial viability (antagonistic effect). Probably the resulting effect of the mixture on cement compounds is synergistic, as bacteria can indeed produce calcium carbonate. Bacterial viability was already recorded with iron oxide solutions, but was not assessed with cement mixtures [7,8].

In addition to the production of CaCO_3 , the second aim is the allocation of this inorganic compound into the concrete pores. The phenomenon responsible for sealing fractures is crystallization, which can be thought of as the inverse of solubilization. Hence, the determination of the solubility curve is essential so that the thermodynamic conditions necessary for the formation of crystals can be achieved [9].

Solubility curves need to adjust the thermodynamic conditions of crystallization to those of bacterial biosynthesis. In other words, a study needs to be conducted within a similar temperature range for both the biochemical reaction and crystallization, bearing in mind that very high temperatures can inactivate, or even kill, the bacteria involved in the biochemical reaction [10].

According to Equation (1), the presence of oxygen, when aeration is used, accelerates the biochemical reaction and favors the evaporation of water through forced convection. The higher the water vapor content in the air, the greater the relative humidity, which is an output variable in both Equations (1) and (2) [11].

In the operationalization of any process, meters, supports, equipment and other instruments need to be integrated, or even created. Three-dimensional (3D) printing is a tool that has been gaining ground due to its broad applicability. In simple terms, practically any object that can be constructed digitally using computational software can also be printed three-dimensionally (within size constraints). Advantages, such as different types of materials (plastics, glass and even chocolate) and printing technology (filament, resin, etc.) have made 3D printing a valuable tool in scientific research [12].

For a prototype, a greater degree of automation in the operations translates to a lower occurrence of human errors and also enables the determination of necessary adjustments. Therefore, a control board is another tool that accelerates the development of research. For instance, the Arduino UNO R3 microcontroller is a low-cost board for hardware and

sensors, which, when combined with 3D printing, enables the construction of effective, low-cost prototypes for the analysis of processes [13,14].

Cracks in concrete form empty spaces in buildings, possibly causing less heat conduction, i.e., greater thermal resistance. The more cracks and the larger their distribution, the higher the temperature gradient, thus affecting heat distribution. Air, despite being a good thermal insulator (low heat conductor), under uncontrolled conditions can create hotspots in factories, making temperature conditions unhealthy for employees and reducing the energy efficiency of the structure. On the other hand, in bridges these temperature differences can cause thermal dilation in the structure, which makes their periodic maintenance necessary [15].

Therefore, the aim of the present study was to construct a prototype called Cascade System for Biomineralization in Cement, dedicated to improving the energy efficiency of buildings. An Arduino UNO R3 microcontroller and 3D printing were used to ensure the efficiency and low cost of the process.

2. Materials and Methods

2.1. Determination of Calcite Solubility Curve

The behavior of the solubility curve of calcium carbonate was studied using 60 pairs of solubility and temperature data for calcite (99%) in demineralized water, which is the most stable polymorph of CaCO_3 [16]. The selected data were between temperatures of 5 and 35 °C, considering that the molar mass of CaCO_3 is $100 \text{ mg}\cdot\text{mmol}^{-1}$. The aim of the curve was to predict the maximum saturation limit at each temperature in order to work under conditions from the non-crystallization of water (above freezing) to the upper limit of the working temperature (35 °C) for bacteria of the genus *Bacillus*. No microorganism was used during data selection, and the only microbial parameter used was the optimum temperature for microorganism growth.

2.2. Cascade System for Biomineralization in Cement (CSBC)

The data from the calcite solubility curve and optimal temperature of bacteria of the genus *Bacillus* enabled the construction of a system to investigate microbial production at 35 °C and the crystallization of calcium carbonate separately. The Cascade System for Biomineralization in Cement (CSBC) was based on the calcium lactate regeneration pathway (Equations (1) and (2)), stemming mainly from the need to regenerate concrete without inducing corrosion in reinforced concrete. The construction of this system was divided into two steps: (I) process engineering step and (II) electrical and programming step.

2.2.1. Process Engineering Step

Figure 1 displays the flowchart of CSBC engineering, which involved the following items:

- RS-A98 compressor (RS Electrical) with four outputs for the injection of air into the environment at a total flow rate of $12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;
- LZT M-6 air rotameter with flow measurement between 0.5 and $4.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Flow Indicator and Controller [FIC]);
- Two Millipore Millex-GV hydrophilic filters with $0.22 \mu\text{m}$ pore diameter;
- Tecnal TE-392/93L bacteriological heat chamber with temperature measurement between 35.0 and 60.0 °C and error of 0.1 °C;
- Five reaction cells (Figure 2) made with glycol-modified polyethylene terephthalate (PETG) by a Furling Yan printer (layer height: 0.2 mm), unit volume (each reactor) of 250 mL and coated with IBEX crystal polyester resin 67; and
- Five rubber gaskets for reactors.

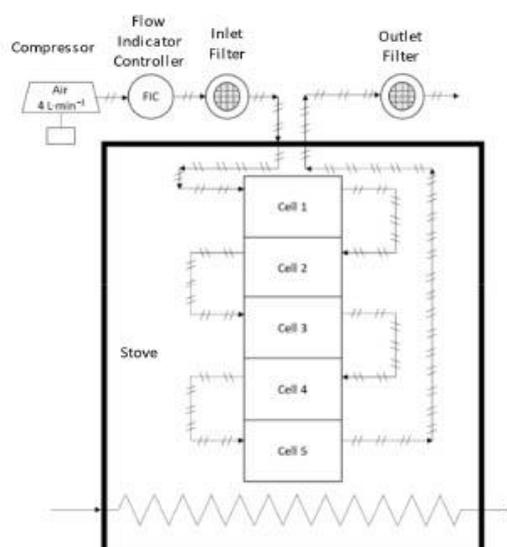


Figure 1. Flow diagram of process engineering of the Cascade System for Biom mineralization in Cement.

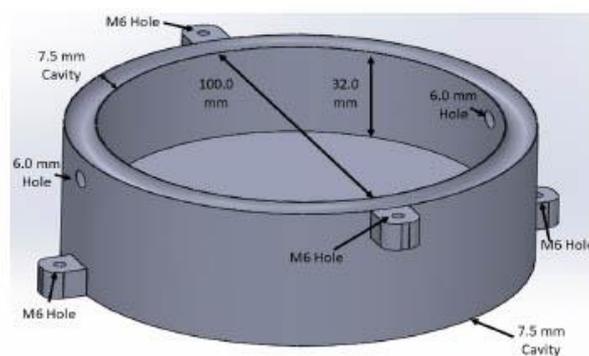


Figure 2. Illustration of Cell of the Cascade System for Biom mineralization in Cement.

The five reaction cells were built in order to be applied in a Factorial Design, by the repetition of experiments under the same air flow rate conditions. Due to the high number of experiments, it was necessary to increase the number of reaction cells to reduce the total experimental time. In other words, the number of five reaction cells was not used to amplify the contact area as in a continuous reactor, but to apply different conditions, excepting air flow, in a set of assays, ordered according to an increasing concentration of reagents.

Compared to a batch reactor, the CSBC has controlled aeration and temperature, as well as facilitating the filtering of microbial cells at the inlet and outlet of the system. Filters were placed at the inlet to prevent indigenous microorganisms from entering the reaction medium via the compressor, thereby avoiding calcium lactate degradation by other species. Filters placed at the outlet were used to prevent inoculated microbial cells from contaminating the external environment.

The reaction cells consisted of Petri dishes adapted with lateral holes for the inlet and outlet of air and were made of a material more resistant than glass (PETG). A space was designed in each cell to house rubber gaskets for 100 mm PVC tubes. Four side connectors were also designed to join each reaction cell to the other cells stacked on top of each another to enable work in series. The system could also have been built up in parallel, but would have required greater flow control in each reaction cell; therefore, the cascade option was the best choice for the process.

In the compressor, it was necessary to combine the four outlets into one, so a lung was designed and built with the 3D printer. This lung was printed in two halves to enable post-processing with resin waterproofing of the entire inner surface to avoid leakages. The two halves were then glued together, and the outer surface was coated with two layers of resin (Figure 3). The maximum air flow rate was $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

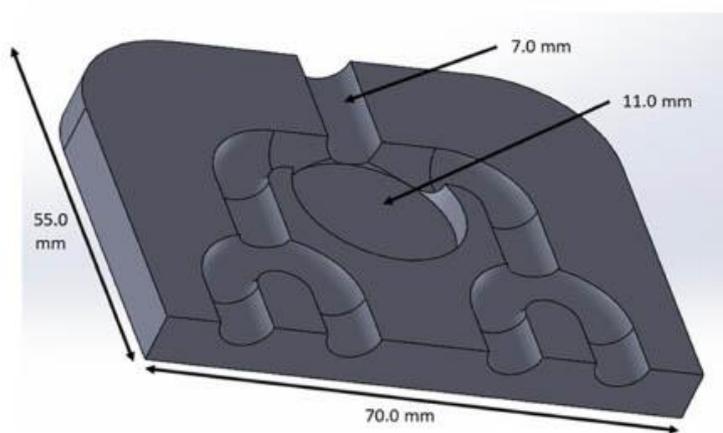


Figure 3. Illustration of one of the halves of the lung for the Cascade System for Biom mineralization in Cement.

The CSBC construction had the following two main objectives: (i) to determine the phenomenon limiting the process and (ii) to determine the best possible environment for the formation of calcium carbonate crystals in cement or concrete. The first objective can be translated into a comparison between the rates of the biochemical reaction and that of crystallization. The slower phenomenon of either conversion of ions into crystals or conversion of lactate into carbonate, would be the rate limiting the process. This is the innovation of the work and the motivation for the construction of the prototype. The process diagram of further experiments is illustrated in Figure 4. The second objective was achieved with the precise control of air flow rate and temperature. The forced convection of air inside the reaction cells removed water molecules by evaporation, while oxygen, accounting for about 21% (v/v) of atmospheric air, reacted with lactate, according to Equation (1), producing water, which was also evaporated by the continuous convection. Therefore, it was necessary to know the inner and outer humidity (environment condition), which required the inclusion of a supervisory control in the CSBC.

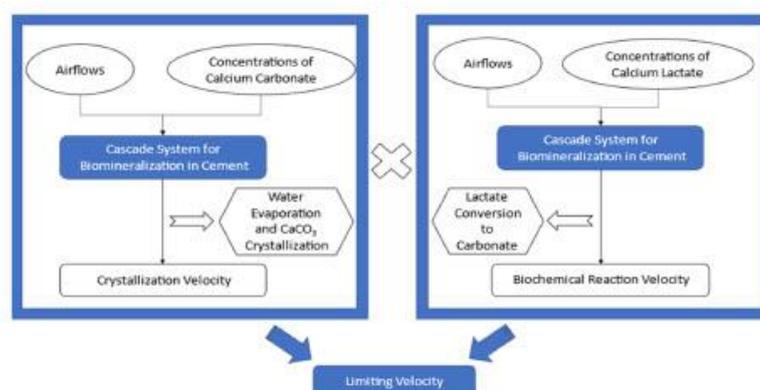


Figure 4. Process diagram of further experiments for the Cascade System for Biom mineralization in Cement.

2.2.2. Instrument, Electrical and Programming Step

After the process, the Arduino UNO R3 hardware was used to measure the humidity inside and outside the CSBC, as well as to activate a compressor (providing aeration for the reaction cells) and an LED (lighting the interior of the heat chamber).

It is important to know the difference between the humidity of the system and the environment, as not all experiments are performed at the same time or on the same day. Moreover, depending on the climatic conditions of the location of the experiment, the humidity of the surrounding environment can change quickly. The Arduino software enables simple arithmetic calculations so that the operator of the supervisory control can directly visualize the desired information (in this case, the difference in humidity). In the present study, the tests were performed in one hour, comparing the differences in humidity between the sensors over one hour in the city of Recife, PE, Brazil.

Tests were also carried out for drying 100 mL of demineralized water in a reaction cell of the CSBC system. The tests were performed in triplicate and with the compressor running at $3 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$ or $5 \times 10^{-5} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$. When the difference in humidity reached the one-hour test limit of the sensors, the drying flow rate of the system was calculated as the total volume of liquid in the container over the total drying time.

A circuit board was put together (Figure 5) with the aid of Fritzing software to represent, in practice, how the supervisory control with the Arduino UNO R3 microcontroller was configured.

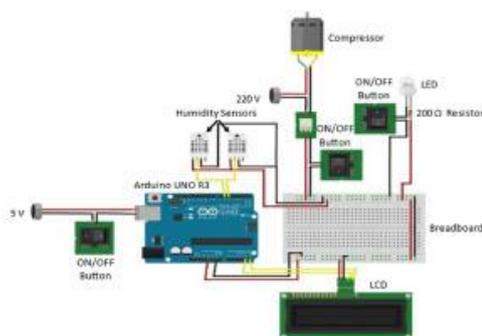


Figure 5. Schematic of electrical circuit of the Cascade System for Biom mineralization in Cement.

The components of the circuit were the following:

- Arduino UNO R3 microcontroller;
- 220 V line filter;
- 5 V source;
- On/off buttons;
- Breadboard;
- Blue LCD screen, 16 × 2 digits, with I2C module;
- Relay module for activation of up to 5 V;
- Two DHT22 humidity sensor modules;
- White LED;
- 200 Ω resistor;
- RS-A98 compressor (RS Electrical); and
- Wires.

Besides the electrical and electronic components, a circuit-breaker box and wire organizer spirals were used to house the circuit and offer protection and stability to the parts and instruments. The supervisory control was connected to a 220 V supply with a current of 10 A. A 5 V source converted the 220 V to the 5 V of supply for the Arduino. A 220 V link was connected directly to the open relay module to be activated only with the supervisory control command.

The total power of the CSBC was also calculated as the sum of powers of the stove, the LED, the two humidity sensors and the Arduino UNO R3 microcontroller.

3. Results

3.1. Determination of Calcite Solubility Curve

Based on data described by Visscher and Vanderdeelen [16], 60 pairs of data were collected at temperatures in the selected range (5–35 °C), and the calcite solubility curve was plotted (Figure S1). The first point to discuss regards the reliability of the data source. The other point deals with the logarithmic solubility curve with a determination coefficient (R^2) of 0.954, indicating that the 60 pairs of data were in good agreement with the curve.

3.2. Cascade System for Biomineralization in Cement (CSBC)

As mentioned earlier, the CSBC was constructed in the following two steps: (I) process engineering and (II) instrument, electrical and programming step.

3.2.1. Process Engineering Step

Figure 6 shows the CSBC with its supervisory control, stove, humidity chamber and humidity sensors. The equipment had an aeration system from the supervisory control to the stove and from the stove to the humidity chamber. Air was taken from the environment and returned to the same environment.

The reaction cells are shown in Figure 7, with a unit printing time for each cell of 15 h and nine minutes, totaling 75 h and 45 min for the whole system. The cover took approximately two hours and there was the time required to apply and dry the resin.

In the control of aeration, the flow was from top to bottom to ensure the least possible loss, since aeration was low. The gaskets and hardened resin ensured that the reaction cells did not leak. The lung of the compressor used to join the four outlets is shown in Figure 8A after being printed and in Figure 8B after being coated with resin. Each half of the lung was produced by the 3D printer in one hour and 47 min.

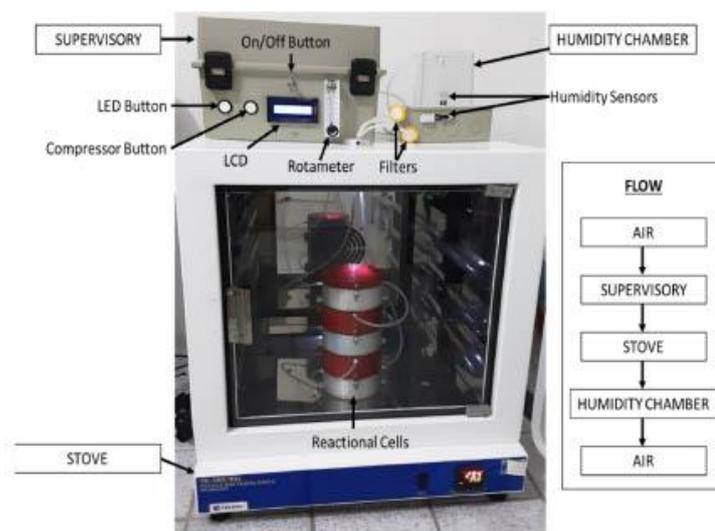


Figure 6. Overall Cascade System for Biomineralization in Cement.



Figure 7. Reaction cells of the Cascade System for Biomineralization in Cement.

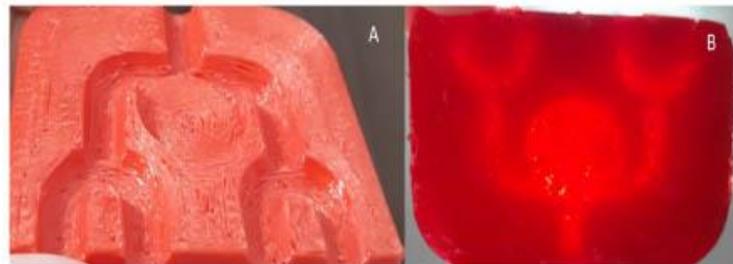


Figure 8. Lung (A) after being printed and (B) after being coated with resin.

3.2.2. Instrument, Electrical and Programming Step

The Arduino UNO R3 microcontroller enabled connections with the different components of the CSBC, such as the compressor, relay module, LED and humidity sensors. The sensors were placed in two different locations. The first location was in the humidity chamber. Water vapor from the reaction cells reached a sensor placed under a transparent dome to enable the reading of the internal humidity of the CSBC. The other location was away from the injection of water vapor of the reaction cells.

Two other important aspects of the difference in humidity are the humidity measurement range and the accuracy of the sensors. Some sensors measure humidity from 20 to 90%; however, depending on climatic conditions and the systems used, humidity can be higher than 90%. The DHT22 sensor selected for the CSBC measured the complete range of humidity (0 to 100%). Moreover, sensors that measure humidity from 20 to 90% have accuracy of $\pm 5\%$, whereas the accuracy of the DHT22 sensor was $\pm 2\%$. This meant that, whereas the difference in humidity could have a propagation of error of up to 10% ($2 \times 5\%$) when using sensors with less accuracy, the two DHT22 sensors used had a propagation of error of up to 4% ($2 \times 2\%$). To test this accuracy, differences in humidity between the two DHT22 sensors were compared for 60 min at 10 min intervals, as shown in Figure 9. The errors did not exceed half of the propagated error, which demonstrated the reliability of the sensors.

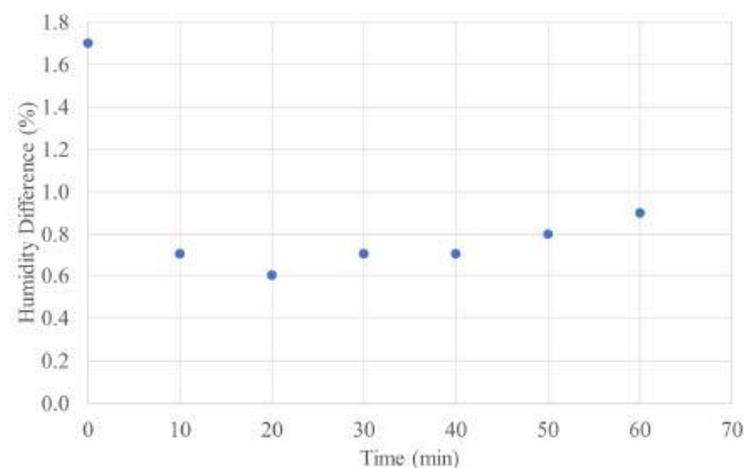


Figure 9. Errors in humidity difference without activation of compressor in the Cascade System for Biominalization in Cement.

At the start, the process showed a minimal difference in humidity, which was considered merely an instrument error. From the moment water from the reaction cells evaporated, the difference in humidity increased until reaching a state of water saturation in the air. Evaporated water came mainly from the solutions in the reaction cells, but also from the reaction of bacterial nutrition by lactate (Equation (1)). When the difference in humidity began to decrease again, it meant that the humidity in the reaction cells was approaching that of the environment.

The total drying time of the 100 mL-volume was 99.83 h with a standard deviation of 0.05 h. Therefore, the drying flow rate was $1.01 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, or $3.10^{-10} \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$. This meant that 0.0006% of the drying output flow came from demineralized water previously contained in the reaction cells and that the prototype was operational for about 100 h.

The programming code for the supervisory control (Code S1) assisted in three ways: in the measurement of humidity, in the determination of the difference in humidity, and in the transformation of this difference into the modulus of the value (always a positive value) such that it was physically compatible with the process.

Powers of the constituents of the operating CSBC were: stove—250 W, Arduino UNO R3—10 W, LED—0.01 W, $2 \times$ humidity sensors— 2×0.014 W, and compressor—12 W. Thus, the total power of the CSBC could be estimated to be around 272 W.

4. Discussion

4.1. Process Engineering Step

Technological applications of 3D printing have been used in different fields of knowledge, such as health, industry, and art. The advantage of using graphic resources for the creation of parts is accessibility for the development of science.

According to Noor et al. [17], a small, vascularized heart was created using the processes of microencapsulation and 3D printing. This technology favors the future creation of artificial human organs, avoiding long waiting lists for organ transplants. In the case of the CSBC, 3D printing was fundamental to build reaction cells of the desired size. In the future, this 3D printing tool could even be used to adapt to different geometries based on factorial designs.

Krimpenis et al. [18] developed a robotic arm for situations of difficult positioning or access, which was made with 3D printing in PETG, due to the strength and durability of the filament. The reaction cells and lung in the present study were also printed with PETG filament, mainly due to the chemical resistance of the material, which was required to cope with potential damage caused by the resin in the absence of chemical protection.

Higueiras et al. [19] photographed a broken Hispano-Roman architectural ornament and reconstructed part of the piece with 3D printing. The authors created a mold for the reconstruction of the piece and filled it with acrylic resin. Building the CSBC did not require the same level of detail as restoring an architectural ornament, but 3D printing assisted in detailing the holes of reaction cells and couplings among reaction cells. Therefore, it is a tool that encourages the researcher's creativity, allowing the creation of different structures.

4.2. Instrument, Electrical and Programming Step

Kondaveeti et al. [14] described the advantages of using Arduino boards in prototypes, such as the low cost of the boards and Arduino kits, operational versatility of the Arduino software, the plurality of sensors, the low energy expenditure of the boards and the fast processing of information. The authors also cited some fields of knowledge in which Arduino is applied, such as residential automation, smart farming, education, security, etc. This versatility of applications and features of Arduino boards consolidates their use in engineering prototypes, such as the CSBC built in this work.

Poh et al. [20] built a portable UV-visible spectrophotometer using the Arduino Nano with a Bluetooth module as the microcontroller. The authors found that the replacement not only made the equipment cheaper, but also provided the portability aspect to the equipment, despite the limitations in certain wavelengths that could be optimized. The

authors also used 3D printing for the fabrication of the equipment, as performed for the CSBC in the present study.

Brasileiro et al. [21] constructed a microbubble generation and measurement unit using an Arduino UNO R3 as the microcontroller. The authors also constructed a sensor for low air flow rates, correlating air flow rate with the pressure of a water column, with an R^2 of 0.98. Likewise, in the construction of the CSBC there was also detail on why the system was built, on how the instrument, electrical and programming steps were made and on what the next steps would be for the study of the response variables.

Sharath et al. [22] designed a “pick and place” robot with an Arduino Mega controller, which is used for projects with a larger number of sensors. The equipment was designed to separate a given object, based on its color, with an efficiency of over 90%. One of the aims of the project was to demonstrate that access to prototyping in homes and workplaces is possible, that more investment in research is needed for this equipment to reach a commercial level. Like the “pick and place” robot project, the CSBC prototype appears as an alternative to inspire scientists to develop their own prototypes using Arduino boards, allowing the delimiting of the variables that they want to work with.

To compare the power of the CSBC (272 W) with that of other electrical equipment in common use, it is noteworthy that a microcomputer requires 300 W to work. In other words, kinetic studies can be carried out at a lower cost than a connected microcomputer in order to increase the useful life of the concrete, making it even more resistant than the standard. According to Brasileiro et al. [6], 4 billion tons of cement are produced every year, which are responsible for 5 to 7% of the world's CO₂ emissions. With the implementation of optimized studies for bio-concrete, mainly with the use of CSBC, the intention is to reduce the consumption of the large amount of cement used both for repairing existing structural works and for new works, as well as improve energy efficiency of buildings.

This prototype was inspired by the experiments of Brasileiro et al. [23] on biomineralization in cement carried out in Petri dishes. In these experiments it was not possible to include, or to measure, the air flow easily due to the geometry of Petri dishes. So, this was the motivation to join 3D printing and the Arduino controller to create the CSBC and to analyze the two velocities.

5. Conclusions

The construction of the Cascade System for Biomineralization in Cement began with the filtering of data from the solubility curve between temperatures of 5 and 35 °C, which is the operational range of the biomineralization process. Considering the biochemical reactions of biomineralization and the control of aeration, the measurement of humidity inside and outside the system, and temperature were chosen as the three key parameters of the CSBC structure. The reaction cells and lung were created with 3D printing, which facilitated the fit of the parts to meet the needs of the project. The Arduino UNO R3 microcontroller assisted in the on/off operationalization of the compressor and LED. The humidity sensors enabled the online measurement of humidity inside and outside the CSBC, as well as the online determination of the difference in humidity. Furthermore, the instrument errors were quite low and acceptable for the work. Details, such as microbial concentration, analysis periods, the behavior of the crystallization curves and the biochemical reaction, will be provided in future studies with a greater focus on the analysis of the rate of the phenomenon limiting the process. The largest limitation of the study is the time required for many tests, but it can be overcome with factorial design. Future research intends to study these behaviors in common concrete systems and, later, in reinforced concrete. This work involved a combination of biotechnology, 3D printing and process control for the creation of the Cascade System for Biomineralization in Cement. The kinetic data that will be acquired will contribute to better control in the applicability of the restoration of concrete structures, thereby avoiding greater consumption of cement, maintaining structures resistant to natural and anthropogenic wear, and improving energy efficiency of buildings.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/en15145262/s1>, Figure S1: Solubility Curve Obtained from Visscher and Vanderdeelen [16] for Variations in Calcite between 5 and 35 °C; Code S1: Arduino Code for Cascade System for Cement Biomineeralization.

Author Contributions: Conceptualization, P.P.F.B. and M.B.; methodology, P.P.F.B. and M.B.; software, P.P.F.B.; validation, P.P.F.B.; formal analysis, P.P.F.B.; investigation, P.P.F.B. and B.A.C.R.; resources, P.P.F.B.; data curation, P.P.F.B.; writing—original draft preparation, P.P.F.B., A.A.C., A.C. and L.A.S.; writing—review and editing, P.P.F.B., A.A.C., A.C. and L.A.S.; visualization, P.P.F.B.; supervision, Y.B.B., L.A.S. and M.B.; project administration, Y.B.B. and M.B.; funding acquisition, A.A.C., A.C., L.A.S. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was conducted with financial support for the research project from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES [Coordination for Advancement of Higher Education Personnel]), Universidade Federal de Pernambuco and Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI [Advanced Institute of Technology and Innovation]) and with the assistance of the team of the Bioengineering Lab of Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP). The authors are also grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq [National Council of Scientific and Technological Development]).

Acknowledgments: This work was developed as part of a thesis to be presented to the Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ [Postgraduate Program in Chemical Engineering]) of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Danish, A.; Mosaberpanah, M.A.; Salim, M.U. Past and present techniques of self-healing incementitious materials: A critical review on efficiency of implemented treatments. *J. Mater. Res. Technol.* **2020**, *9*, 6883–6899. [\[CrossRef\]](#)
2. Neville, A.M. *Propriedades do Concreto*, 5th ed.; Bookman: Porto Alegre, Brazil, 2016.
3. Vijay, K.; Murrmu, M.; Deo, S.V. Bacteria based self-healing concrete—A review. *Constr. Build. Mater.* **2017**, *152*, 1008–1014. [\[CrossRef\]](#)
4. Bastzyk, A.; Fiedot-Tobola, M.; Polowczyk, I.; Legawiec, K.; Plaza, G. Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 145–152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Sidiq, A.; Gravina, R.; Giustozzi, F. Is concrete healing really efficient? A review. *Constr. Build. Mater.* **2019**, *205*, 257–273. [\[CrossRef\]](#)
6. Brasileiro, P.P.F.; Brandão, Y.B.; Sarubbo, L.A.; Benachour, M. Self-Healing Concrete: Background, Development, and Market Prospects. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2021**, *11*, 14709–14725. [\[CrossRef\]](#)
7. Arakha, M.; Pal, S.; Samantarai, D.; Panigrahi, T.K.; Mallick, B.C.; Pramanik, K.; Mallick, B.; Jha, S. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14813. [\[CrossRef\]](#)
8. Gholani, A.; Mohammadi, E.; Ghasemi, Y.; Omidifar, N.; Ebrahiminezhad, A. Antibacterial activity of SPIONs versus ferrous and ferric ions under aerobic and anaerobic conditions: A preliminary mechanism study. *IET Nanobiotechnol.* **2020**, *14*, 155–160. [\[CrossRef\]](#)
9. Guardani, R.; Seckler, M.M.; Giulietti, M. Cristalização. In *Purificação de Produtos Biotecnológicos*; Kilikian, B.V., Pessoa Júnior, A., Eds.; Blucher: São Paulo, Brazil, 2020; pp. 549–584.
10. Reddy, P.V.Y.; Ramesh, B.; Kumar, L.P. Influence of bacteria in self healing of concrete—A review. *Mater. Today Proc.* **2020**, *33*, 4212–4218. [\[CrossRef\]](#)
11. Seifan, M.; Samani, A.K.; Berenjhan, A. New insights into the role of pH and aeration in the bacterial production of calcium carbonate (CaCO₃). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 3131–3142. [\[CrossRef\]](#)
12. Portanguen, S.; Tournayre, P.; Sicard, J.; Astruc, T.; Mirade, P.-S. Toward the design of functional foods and biobased products by 3D printing: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *86*, 188–198. [\[CrossRef\]](#)
13. Cai, S.; Ma, Z.; Skibniewski, M.J.; Bao, S. Construction automation and robotics for high-rise buildings over the past decades: A comprehensive review. *Adv. Eng. Inform.* **2019**, *42*, 1–18. [\[CrossRef\]](#)
14. Kondaveeti, H.K.; Kumaravelu, N.V.; Vanambathina, S.D.; Mathe, S.E.; Vappangi, S. A systematic literature review on prototyping with Arduino: Applications, challenges, advantages, and limitations. *Comput. Sci. Rev.* **2021**, *40*, 100364. [\[CrossRef\]](#)
15. Bala, A.; Gupta, S. Thermal resistivity, sound absorption and vibration damping of concrete composite doped with waste tire Rubber: A review. *Constr. Build. Mater.* **2021**, *299*, 123939. [\[CrossRef\]](#)

16. Visscher, A.D.; Vanderdeelen, J. IUPAC-NIST Solubility Data Series 95. Alkaline Earth Carbonates in Aqueous Systems. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2011**, *41*, 023105. [[CrossRef](#)]
17. Noor, N.; Shapira, A.; Edri, R.; Gal, I.; Wertheim, L.; Dvir, T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1900344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Krimpenis, A.A.; Papapaschos, V.; Bontarenko, E. HydraX, a 3D printed robotic arm for Hybrid Manufacturing Part I: Custom Design, Manufacturing and Assembly. *Procedia Manuf.* **2020**, *51*, 103–108. [[CrossRef](#)]
19. Higueiras, M.; Calero, A.I.; Collado-Montero, F.J. Digital 3D modeling using photogrammetry and 3D printing applied to the restoration of a Hispano-Roman architectural ornament. *Digit. Appl. Archaeol. Cult. Herit.* **2021**, *20*, e00179. [[CrossRef](#)]
20. Poh, J.; Goh, N.W.; Tan, S.M.; Gan, S.K. Spectrophotometer On-The-Go: The Development of a 2-in-1 UV-Vis Portable Arduino-Based Spectrophotometer. *Sens. Actuators A Phys.* **2021**, *325*, 112698. [[CrossRef](#)]
21. Brasileiro, P.P.F.; Santos, L.B.; Chaprão, M.J.; Almeida, D.G.; Soares da Silva, R.C.F.; Roque, B.A.C.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A.; Benachour, M. Construction of a microbubble generation and measurement unit for use in flotation systems. *Chem. Eng. Res. Des.* **2020**, *153*, 212–219. [[CrossRef](#)]
22. Sharath, G.S.; Hiremath, N.; Manjunatha, G. Design and analysis of gantry robot for pick and place mechanism with Arduino Mega 2560 microcontroller and processed using pythons. *Mater. Today Proc.* **2021**, *45*, 377–384. [[CrossRef](#)]
23. Brasileiro, P.P.F.; Soares da Silva, R.C.F.; Rocha e Silva, F.C.P.; Brandão, Y.B.; Sarubbo, L.A.; Benachour, M. Biomineralization of calcium carbonate by *Bacillus cereus* for self-healing bio cement. *Chem. Eng. Trans.* **2020**, *79*, 97–102. [[CrossRef](#)]

ANEXO A – DADOS OBTIDOS DE VISSCHER E VANDERDEELEN (2011) PARA AS SOLUBILIDADES DA CALCITA

Temperatura (°C)	Solubilidade (g·(1000 mL) ⁻¹)
5,0	1,323
5,0	1,324
5,0	1,325
7,5	1,224
8,5	1,202
9,5	1,115
9,9	1,192
9,9	1,194
9,9	1,202
9,9	1,203
9,9	1,204
10,0	1,198
10,0	1,202
10,0	1,202
14,7	1,105
14,7	1,106
15,1	1,117
15,5	1,002
15,5	1,032
16,0	1,081
16,0	1,088
18,0	0,970
20,5	0,975
21,5	0,935
21,5	0,965
22,0	0,920
23,0	0,853
24,0	0,873
24,6	0,913
25,0	0,889
25,0	0,891
25,0	0,901
25,0	0,909
25,0	0,910
25,0	0,910
25,0	0,910
25,0	0,910

Temperatura (°C)	Solubidade (g·(1000 mL) ⁻¹)
25,0	0,913
25,0	0,914
25,0	0,914
25,0	0,918
25,0	0,924
25,0	0,924
25,0	0,924
25,0	0,924
25,0	0,946
25,0	0,946
25,5	0,901
25,5	0,902
25,5	0,904
25,5	0,907
26,0	0,875
26,5	0,860
26,5	0,885
27,0	0,885
35,0	0,751
35,0	0,752
35,0	0,756
35,0	0,770
35,0	0,801