



LAÉRCIO MESQUITA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE AGENTE BIOLÓGICO PARA
AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATRIZES CIMENTÍCIAS**

**LAVRAS - MG
2023**

LAÉRCIO MESQUITA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE AGENTE BIOLÓGICO PARA AUTOCICATRIZAÇÃO
EM MATRIZES CIMENTÍCIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Compósitos e Nanocompósitos Lignocelulósicos para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Giovanni Francisco Rabelo
Orientador

Prof. Dr. Saulo Rocha Ferreira
Co-orientador

Profa. Dra. Maria Alves Ferreira
Co-orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Mesquita Júnior, Laércio.

Desenvolvimento de agente biológico para autocicatrização em
matrizes cimentícias / Laércio Mesquita Júnior. - 2022.

98 p. : il.

Orientador(a): Giovanni Francisco Rabelo.

Coorientador(a): Saulo Rocha Ferreira, Maria Alves Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Inibição. 2. Celulose. 3. *Pythium aphanidermatum*. I. Rabelo,
Giovanni Francisco. II. Ferreira, Saulo Rocha. III. Ferreira, Maria
Alves. IV. Título.

LAÉRCIO MESQUITA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE AGENTE BIOLÓGICO PARA AUTOCICATRIZAÇÃO
EM MATRIZES CIMENTÍCIAS**

**DEVELOPMENT OF A BIOLOGICAL AGENT FOR SELF-HEALING IN CEMENT
MATRICES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Compósitos e Nanocompósitos Lignocelulósicos para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 30 de novembro de 2022.

Dr. Giovanni Francisco Rabelo - UFLA

Dr. Saulo Rocha Ferreira - UFLA

Dra. Luciana Barbosa de Abreu - UFLA

Dr. Keoma Defaveri do Carmo e Silva - UFLA

Dr. Visar Krelani - UBT - Faculty for Civil Engineering and Infrastructure

Prof. Dr. Giovanni Francisco Rabelo
Orientador

Prof. Dr. Saulo Rocha Ferreira
Co-orientador

Profa. Dra. Maria Alves Ferreira
Co-orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

*Aos meus pais,
Laércio Mesquita e Maria Aparecida de Oliveira Mesquita,
pelo amor, confiança, ensinamentos e dedicação.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo incentivo e atenção.

À toda minha família: Paulo César, Lucas, Ana Paula, Francesca, Janaína, Neto, Mariana, Maria Paula, João Pedro, Laura, Isabela, Rafael e Felipe, pelo incentivo nos momentos difíceis.

A minha namorada Bruna, pela compreensão e paciência e incentivo nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, pela oportunidade de cursar o doutorado e a Capes, pela concessão da bolsa, o que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Giovanni Francisco Rabelo, pela orientação, confiança, paciência e amizade.

Ao co-orientador Dr. Saulo Rocha Ferreira, pelas colaborações, sugestões, apoio, paciência e amizade.

A professora Dra. Maria Alves Ferreira, pela disposição, incentivo e colaborações.

A Gabrielle Avelar Silva, pela amizade, colaborações e ajuda nos trabalhos.

Aos membros do Laboratório de Fitopatologia Florestal e demais amigos da pós-graduação e da graduação da UFLA, pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos, momentos de descontração, paciência e companheirismo.

Aos membros da banca de defesa, pelas correções, sugestões e avaliação deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

*“A diferença entre o possível e o impossível
está na vontade humana.”*

(Louis Paster).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de *Pythium* spp. como um agente autocicatrizante em matrizes cimentícias, uma vez que ele é composto por celulose, que atrai Ca^{2+} e favorece a formação de CaCO_3 , podendo também atuar como reforço. Para atenuar a inibição dos nutrientes batata e dextrose (BD), utilizou-se CaCl_2 , sendo necessário que o *Pythium* se desenvolvesse em meios com CaCl_2 e pH alcalino, uma vez que a matriz cimentícia possui $\text{pH} > 10$. Adotou-se a concentração de 100% (24g/L) de BD, conforme indicado. Para avaliar a autocicatrização, o *Pythium* foi inoculado em fissuras em corpos de prova (CP) de argamassa (a/c 0.3), criadas por uma serra metálica (0,3 mm), e a autocicatrização foi visualizada aos 3, 7, 28 e 56 dias após a inoculação. Além disso, produziram-se CP com 1% de fibras de polipropileno, fissurados em ensaio de flexão, e realizaram-se testes de recuperação de área (RA), absorção de água (AA), recuperação de carga (RC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por dispersão de elétrons (EDS) em 7, 28 e 56 dias. A espécie *Pythium aphanidermatum* foi identificada por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase). Com relação ao CaCl_2 , aos 7 dias, os tratamentos de 0% e 25% foram estatisticamente iguais, enquanto aos 14 dias houve uma constante até 150%. O agente biológico desenvolveu-se bem em pH10. A curva de inibição BD 24g/L mostrou ser inapropriada para matriz cimentícia, enquanto o índice de inibição BD 6g/L obteve Inibição Baixa em 150%, 175% e 200%. O meio apropriado preconizado foi de 6g/L de BD com 150% de CaCl_2 . A termogravimetria derivada (DTG) confirmou que o *Pythium* é basicamente celulose. A vedação iniciou-se em 3 dias e evoluiu totalmente até 56 dias, com 105% de RC, 98,43% de RA e redução na AA. A MEV e a EDS evidenciaram a hifa carbonatada e cristais de carbonatos, aluminatos e C-S-H na região fissurada, sugerindo a presença do *Pythium aphanidermatum* como um agente autocicatrizante promissor.

Palavras-chave: Inibição. Celulose. *Pythium aphanidermatum*. Autocicatrização.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate *Pythium spp.* as a self-healing agent in cementitious matrices since it is composed of cellulose and that these attract Ca^{2+} which favor the formation of CaCO_3 , in addition, it would also act as a reinforcement. CaCl_2 was used to attenuate nutrient potato and dextrose (BD) inhibition. *Pythium* has to develop in media with CaCl_2 and alkaline pH, as the matrix has $\text{pH} > 10$. 100% (24g/L) BD concentration was adopted, which is indicated. To evaluate self-healing, *Pythium* was inoculated into cracks in mortar test specimens (CP) (w/c 0.3), made using a metal saw (0.3 mm) after 14 days, visualized at 3, 7, 28 and 56 days after agent inoculation. CP were also produced with 1% polypropylene fibers, cracked in a flexion test and area recovery (RA), water absorption (AA), load recovery (RC), SEM and EDS tests were performed in 7, 28 and 56 days. Identification by PCR (polymerase chain reaction) determined the species *Pythium aphanidermatum*. Regarding CaCl_2 , at 7 days, the 0% and 25% treatments were statistically the same. At 14 days, it was constant up to 150%. The biological agent has developed to pH10. The BD 24g/L inhibition curve showed that it is inappropriate in cementitious matrix. The BD 6g/L inhibition index obtained Low Inhibition at 150%, 175% and 200%. The appropriate recommended medium was 6g/L of BD with 150% CaCl_2 . DTG confirmed that *Pythium* is basically cellulose. The sealing starts in 3 days and evolves completely up to 56 days. With 105% CR, 98,43% RA and AA reduction. SEM and EDS showed carbonate hyphae and crystals of carbonates, aluminates and C-S-H in the fissured region. All these factors show *Pythium aphanidermatum*. promising as a self-healing agent.

Keywords: Inhibition. Cellulose. *Pythium aphanidermatum*. Self-healing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Autocicatrização autônoma baseada em cápsulas ou nos sistemas vasculares com agentes cicatrizantes bicomponentes 16
- Figura 2 - Abordagem de cicatrização autógenas: (a) restrição da abertura de fissura, (b) fornecimento de água e (c) hidratação contínua e cristalização 17
- Figura 3 - Representação simplificada da precipitação de CaCO_3 induzida por bactérias ureolíticas: (a) hidrólise da ureia, (b) início da formação de cristais, (c) cristalização completa e (d) movimento dos cristais 20

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Autocicatrização	14
3.2 Abordagem da autocicatrização	15
3.2.1 Autocicatrização autônoma	15
3.2.2 Autocicatrização autógena do concreto	15
3.3 Mecanismos de autocicatrização	17
3.3.1 Autocicatrização por escória de alto forno	17
3.3.2 Autocicatrização por exposição à água	18
3.3.3 Autocicatrização por esporos de bactérias	18
3.3.4 Autocicatrização induzida por fibras	20
3.3.5 Autocicatrização induzida por fibras de celulose	20
3.4 <i>Oomiceto pythium</i>	21
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS	23
SEGUNDA PARTE	27
ARTIGO 1 – Efeito do pH alcalino e do CaCl ₂ no desenvolvimento do <i>Pythium</i> spp. visando sua utilização como agente de autocicatrização em matrizes cimentícias	27
ARTIGO 2 – Avaliação experimental da utilização do <i>Pythium aphanidermatum</i> como agente biológico de autocicatrização de matrizes cimentícias.....	50
ANEXO – Documentos da patente	75

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O cimento é um elemento muito importante na construção civil por apresentar várias qualidades que se referem à durabilidade e resistência. Apesar de suas várias qualidades, os materiais a base de cimento apresentam fissuras ao longo de sua vida útil, sendo esta uma característica intrínseca desses materiais. Essas fissuras aumentam a permeabilidade nas estruturas, possibilitando a penetração de agentes agressivos, tais como cloretos e sulfatos, que podem promover o desgaste de componentes metálicos, como os vergalhões e fibras. Isso poderá comprometer a performance mecânica do material ou estrutura. As fissuras cuja abertura se encontram abaixo de 400 μm são denominadas microfissuras e não são consideradas uma ameaça imediata à integridade estrutural. Vários são os estudos para conter o avanço e restaurar as fissuras a fim de preservar a integridade de estruturas de materiais a base de cimento. Dentre eles destacam-se aqueles destinados ao desenvolvimento de matrizes autocicatrizantes aplicados a estruturas de materiais a base de cimento aplicados às estruturas.

O conceito de autocicatrização em materiais à base de cimento é novo e progrediu significativamente nas duas últimas décadas. O fenômeno foi identificado no concreto no início do século XIX e o conceito foi gradualmente estabelecido por vários pesquisadores, destacando Reinhardt e Jooss no ano de 2003.

Os processos de autocicatrização são classificados em dois grupos principais, autocicatrização autógena, relacionada às propriedades intrínsecas da matriz e autocicatrização autônoma, que é obtida com introdução de materiais que não fazem parte da composição natural da matriz cimentícia. Nesse sentido, a adição de esporos bacterianos na matriz cimentícia tem ganhado destaque pela capacidade de produção de carbonato de cálcio, que selam as fissuras. A carbonatação também pode ser conseguida por meio da introdução de celulose, que tem a capacidade de retenção de íons de cálcio.

Diante da necessidade de selamento das fissuras, vários produtos foram lançados no mercado da construção civil. Todavia, os produtos de prateleira apenas promovem o selamento de fissuras.

A introdução de celulose no processo de vedação da fissura introduzirá um reforço estrutural na mesma, o que permite um reparo mais eficiente, podendo evitar o aparecimento de novas fissuras no local selado.

Este trabalho visa desenvolver um agente biológico para emprego em cicatrização acelerada de materiais à base de cimento e que possibilite o uso em escala comercial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um agente biológico para induzir a cicatrização acelerada em materiais à base de cimento.

2.2 Objetivos específicos

1. Encontrar um agente biológico que produza celulose e que possa se desenvolver ao ambiente da matriz cimentícia;
2. Avaliar o impacto do agente biológico na hidratação da matriz cimentícia;
3. Avaliar as características desse agente biológico em relação às suas interferências nas propriedades físicas e mecânicas da matriz, bem como sua aplicação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Autocicatrização

Materiais à base de cimento são amplamente utilizados como material de construção devido suas características mecânicas, disponibilidade e trabalhabilidade. Entretanto, uma de suas características é que fissuras surgem com o decorrer de sua vida útil e são muitos os fatores que podem contribuir para que isso ocorra, como: aplicação de cargas, retração, variação térmica entre outros. Essas fissuras criam dutos que irão dar acesso a água e outros produtos químicos que podem degradar a estrutura, comprometendo sua estabilidade. Além disso, com o tempo, fissuras maiores tendem a surgir, o que não apenas prejudica a durabilidade, mas também destrói a estanqueidade. Os danos causados por fissuras em construções necessitam de manutenção e reparos que causam prejuízos econômicos (LI et al., 2019).

As fissuras da matriz cimentícia incluem fissuras superficiais e microfissuras internas. As fissuras superficiais podem ser reparadas por produtos químicos, rejuntamento e materiais de revestimento, mas a camada de reparação da superfície fissurada é fácil de descolar após um período de tempo, e as microfissuras internas não podem ser reparadas (DU et al., 2019).

Então o fenômeno da autocicatrização tem recebido muita atenção por causa de seu ótimo potencial para preencher microfissuras internas e fissuras superficiais ao mesmo tempo, reduzir os custos de manutenção e prolongar a vida útil das estruturas (BLAISZIK et al., 2010).

Define-se por autocicatrização da matriz cimentícia a propriedade de se recompor, auto-cicatizar, realizando o fechamento das fissuras e muitas vezes recuperando as características mecânicas originais (MOREIRA, 2017).

Mesmo tendo sido constatado pela primeira vez há bastante tempo, os estudos sobre a autocicatrização voltados à prevenção dos danos e aumento da durabilidade do concreto são relativamente recentes (REINHARDT et al., 2013).

Segundo Schlangen (2013) os edifícios centenários sobreviveram a esses séculos por causa da capacidade inerente de autocura dos ligantes usados para cimentar blocos de construção. Essa capacidade de autocura nunca havia sido denominada.

Em 2005, iniciaram-se os estudos do Comitê Técnico para Fenômenos de Autocura, em materiais à base de cimento SHC 221, na União Internacional de Laboratórios e Especialistas em Materiais, Sistemas e Estruturas de Construção (RILEM), para pesquisar uma solução capaz de reparar trincas e fissuras estáticas com até 0,4 mm no concreto

estrutural de edificações. Desde então, o fenômeno da autocicatrização tem recebido muita atenção da comunidade científica por causa de seu ótimo potencial para preencher microfissuras internas e fissuras superficiais ao mesmo tempo, reduzir os custos de manutenção e prolongar a vida útil das estruturas (BLAISZIK et al., 2010).

RILEM (2013) descreve a autocicatrização como qualquer processo que envolve a recuperação do próprio material e gera aperfeiçoamento no desempenho desse, que havia sido prejudicado por algum agente nocivo ou sofrido degradações. Existem diferentes mecanismos e abordagens que originam a propriedade de autocicatrização em materiais cimentícios.

3.2 Abordagem da autocicatrização

A autocicatrização em materiais cimentícios pode ser classificada basicamente em dois grupos: autocicatrização autônoma (baseada em cápsulas e autocicatrização vascular) e autocicatrização autógena (autocicatrização intrínseca) (BLAISZIK et al., 2010).

No primeiro, os agentes cicatrizantes são encapsulados no concreto (rede de tubos de vidro microvascular ou microcápsula) para reparar as fissuras (YANG et al., 2011). Já a autocicatrização autógena é um processo de reparação intrínseca do material cimentício, que ocorre devido à hidratação do cimento remanescente não hidratado, bem como à carbonatação do hidróxido de cálcio nos planos das fissuras (EDVARSEN, 1999).

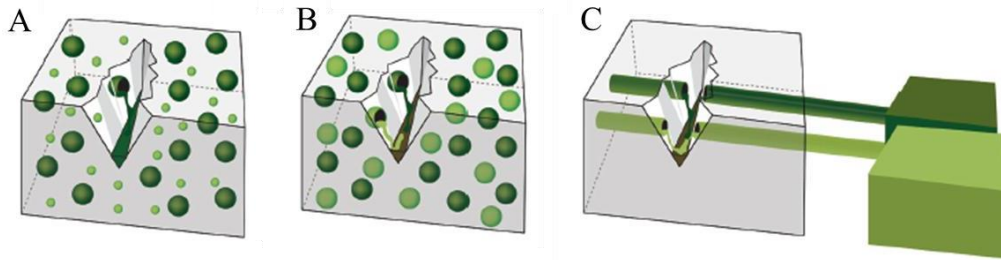
3.2.1 Autocicatrização autônoma

A autocicatrização autônoma é realizada após a interferência de uma ação externa. Nesse caso, ocorrem introduções na composição do concreto como cinza volante e materiais expansivos na mistura inicial do concreto. Há cicatrização autônoma quando o processo utiliza materiais que não seriam encontrados na composição e foram adicionados para este fim (RILEM, 2013).

Segundo Moreira (2017), a cicatrização autônoma representa a propriedade de cicatrização introduzida para agir na fissura, ou seja, o processo de regeneração acontece como consequência de adições realizadas no concreto. As adições são incorporadas propositalmente na matriz do cimento, com a finalidade de selar a fissura ou acelerar a sua cura, em um ambiente contendo umidade. A vista dessa definição, o uso de adições com propriedade pozolânicas, como a cinza volante, pode ser considerado uma vertente da cicatrização autônoma, pois a hidratação contínua destas tem alto potencial de cicatrização no concreto. Tittleboom (2013) apresenta a cicatrização autônoma baseada na inserção de

cápsulas ou sistemas vasculares contendo agentes cicatrizantes, que são liberados para responder a fissuração do concreto, sendo que estes podem reagir, ou não, com um segundo componente na matriz cimentícia (HUANG et al., 2016).

Figura 1 - Cicatrização autônoma baseada em cápsulas ou nos sistemas vasculares com agentes cicatrizantes bicomponentes.



Fonte: VAN TITTELBOOM e DE BELIE (2013).

De acordo com Takagi (2013), outra forma de obter a cicatrização autônoma é através do uso de catalisadores cristalinos como agentes cicatrizantes. Esses atuam como impermeabilizantes hidrofílicos, consumindo o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para formar produtos cristalinos que desconectam poros e preenchem fissuras no concreto. São classificados como cicatrizantes por conta de as reações ocorrerem apenas quando houver umidade suficiente, que em geral é proporcionada pelo transporte de água através das fissuras. A formação cristalina dos produtos varia entre cristais de etringita, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio e C-S-H, sendo os dois últimos responsáveis pela recuperação das propriedades mecânicas.

3.2.2 Autocicatrização autógena do concreto

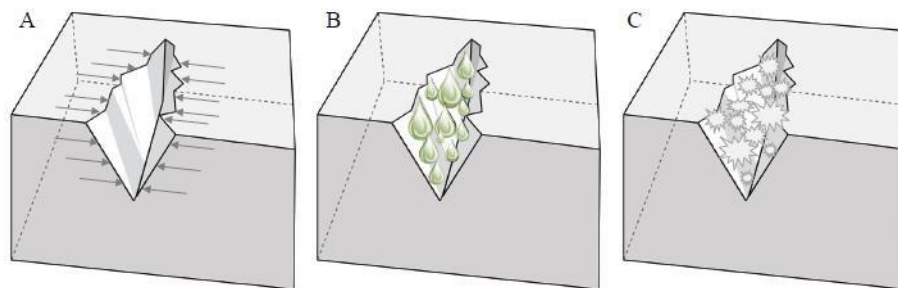
O fenômeno de autocicatrização autógena da matriz cimentícia, que é largamente atribuído à dissolução e a deposição de hidratos induzida por catalisadores ativos, deve ser diferenciado do fenômeno da colmatação autógena, que é devido à hidratação contínua de materiais não hidratados e com a nucleação do carbonato de cálcio (CaCO_3) e subsequente crescimento de cristais. (QURESHI et al, 2018)

Duas diferenças principais são: (a) o efeito autocicatrizante é observado mesmo em um sistema fechado de CO_2 , onde não é possível a carbonatação do hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dissolvido no concreto, e (b) o fenômeno de autocicatrização torna-se significativo após intensa microfissuração, geralmente causada por retração por secagem e/ou carregamento cíclico durante a vida útil de uma estrutura de concreto. Ambas são dependentes

da exposição à água, enquanto que o fenômeno da hidratação contínua pode prosseguir em condições latentes (HEARN, 1998).

Torna-se claro que a colmatação natural pode ser melhorada, sendo mais eficaz quando as larguras das fissuras são restritas ou pode ser provocado o fechamento da fissura (Figura 2-A). Como a água é sempre necessária para ocorrer a colmatação autógena, a retenção de água pode ser outro fator de melhoria (Figura 2-B). Melhorando a possibilidade de hidratação ou cristalização contínua (Figura 2-C) promove-se a melhoria da colmatação autógena. Podemos então chamar este processo de autocicatrização autógena (VAN TITTELBOOM e DE BELIE, 2013).

Figura 2 - Abordagens de cicatrização autógenas: (A) restrição da abertura da fissura, (B) o fornecimento de água e (C) hidratação contínua e a cristalização.



Fonte: VAN TITTELBOOM e DE BELIE (2013).

3.3 Mecanismos de autocicatrização

Diversos métodos de autocicatrização foram desenvolvidos, tanto por processos autônomos como autógenos. Alguns destes serão apresentados a seguir.

3.3.1 Autocicatrização por escória de alto forno

Com ênfase na sustentabilidade, o uso de subprodutos industriais, como as escórias de alto-forno, na composição do cimento tem se tornado uma tendência cada vez mais comum. Com o intuito de aumentar os níveis de substituição, sem afetar negativamente e até mesmo com o objetivo de melhorar algumas das propriedades do concreto (DE BELIE, et al., 1996).

Embora deva ser considerado o efeito positivo da hidratação das partículas da escória nos concretos autocicatrizantes com escórias de alto forno, a vulnerabilidade à carbonatação desses concretos pode ser atribuída a sua alta permeabilidade ao gás carbônico (CO_2) e ao

baixo teor de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Entretanto, o baixo teor de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e uma estrutura de poros mais refinada do concreto com escória de alto forno pode contribuir para uma maior resistência química destes concretos (DE BELIE et al., 1996).

No estudo de De Belie (2010) com ensaios acelerados de carbonatação em concretos contendo diferentes teores de escória de alto forno (50%, 70% e 85%), onde considerou o efeito da hidratação contínua da escória, foi estimado uma profundidade de carbonatação para uma vida útil de 50 anos. Os ensaios revelaram que, embora o concreto de escória de alto forno tenha uma resistência à carbonatação mais baixa que o cimento Portland comum, a estimativa da profundidade de carbonatação no final da vida útil de 50 anos deste concreto pode ainda ser aceitável em ambientes normais.

3.3.2 Autocicatrização por exposição à água

A condição de exposição da matriz cimentícia à água desempenha um papel importante no processo de autocicatrização. Em geral, na condição de exposição em ciclos alternados de úmido/seco, o concreto avaliado mostrou a recuperação mecânica ideal, enquanto que na condição de exposição somente ao ar, não foi observada qualquer evidência de cicatrização. Na condição de exposição à água renovada regularmente, foi observada uma recuperação mecânica ligeiramente superior na condição de exposição contínua à água (SISOMPHON et al., 2012).

Entre as diferentes condições de exposição à água, a condição de exposição a ciclos alternados de úmido/seco, que mostrou a maior recuperação das propriedades mecânicas, pode promover a interação de água com o CO_2 e com os materiais cimentícios não hidratados. Pode-se supor que, durante a fase de secagem, conforme o excesso da água vai evaporando, as concentrações de íons presentes na água dentro das fissuras são aumentadas. Nessa situação, a quantidade de reagentes fica bastante concentrada para que reações adicionais ocorram, enquanto que a quantidade de água na solução se mantém suficiente. Este fenômeno reforçaria as reações químicas de precipitação e da hidratação contínua. Além disso, a penetração de CO_2 na fissura, durante o período de secagem, conduziria à formação adicional de carbonatos, que são úteis para o selamento das fissuras (SISOMPHON et al., 2012)

3.3.3 Autocicatrização por esporos de bactérias

Nas abordagens de Wang et al. (2012) quanto ao uso de bactérias como agentes cicatrizantes, sempre existiu a preocupação com o período de tempo em que bactérias

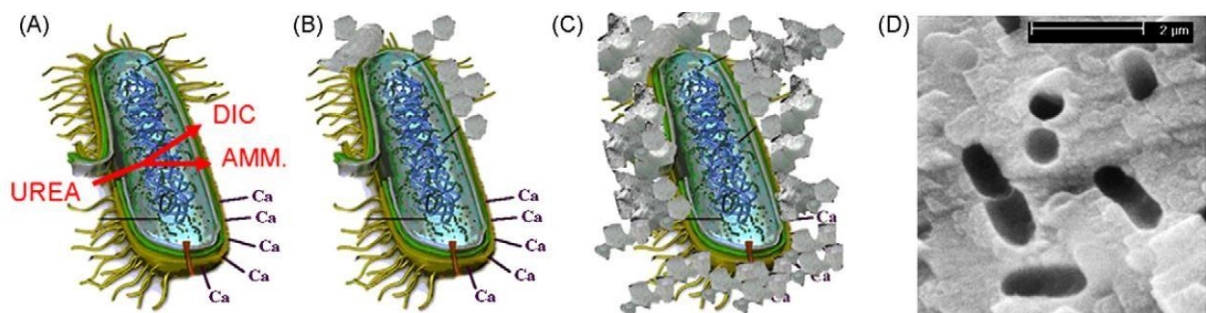
ficariam ativas. Concluíram por trabalhar com esporos, que são células bacterianas dormentes que podem resistir a tensões mecânicas e químicas e permanecem viáveis durante períodos maiores que 50 anos.

Para ativar o concreto autocicatrizante bacteriano, precisam estar presentes dentro da fissura, tanto água quanto oxigênio (O_2). Mesmo que a água seja sugada para dentro das microfissuras devido à ação capilar, surge a dúvida se estará presente O_2 suficiente no interior das fissuras. Enquanto Wiktor e Jonkers (2011) passaram a indicar o uso de esporos de bactérias como uma proteção apenas superficial até o momento, Wang et al. (2012) adicionaram nitrato nos nutrientes, como um receptor de elétrons alternativo para tornar possível a precipitação bacteriana de $CaCO_3$ dentro da fissura sem a presença de O_2 .

A precipitação bacteriana de $CaCO_3$ através da hidrólise microbiana de ureia apresenta diversas vantagens em relação aos outros caminhos geradores de carbonato. Como pode ser facilmente controlada, tem o potencial para produzir grandes quantidades de carbonato dentro de um curto período de tempo. A hidrólise de ureia é catalisada por meio de urease. Como consequência, a ureia é degradada em carbonato e amônia, o que resulta num aumento do pH e da concentração de carbonato no meio ambiente bacteriano (DE MUYNCK et al., 2010).

Uma representação simplificada dos eventos que ocorrem durante a precipitação de carbonatos $CaCO_3$ induzida por bactérias ureolíticas é dada na Figura 3. Íons de cálcio na solução são atraídos para as paredes das células das bactérias devido à sua carga negativa, o que resulta na formação de cristais de carbonato na célula da bactéria.

Figura 3: Representação simplificada da precipitação de $CaCO_3$ induzida por bactérias ureolíticas: (A) hidrólise da ureia, (B) início da formação dos cristais, (C) cristalização completa e (D) MEV dos cristais.



Fonte: DE MUYNCK, et al. (2010).

3.3.4 Autocicatrização induzida por fibras

Quando as fibras são misturadas no concreto a fim de controlar a abertura de fissura, ao invés de criar uma única fissura, múltiplas fissuras aparecem após o carregamento, pois ocorre uma distribuição dos esforços por toda a matriz. Devido a essa característica, Li et al. (2002) propuseram o uso das fibras com o objetivo de restringir a abertura da fissura e assim promover a cicatrização autógena.

A eficiência das fibras de aço, de polipropileno (PP), de poliestireno (PE) e de poliacetado de vinila (PVA) como indutoras da autocicatrização autógena foram comparadas por Homma et al. (2009). As fibras de PVA foram as que induziram a maior eficiência na capacidade de cicatrização, e pode ser atribuído ao fato das fibras de PVA poderem promover a deposição de produtos de cristalização, tais como grupos hidroxilas, ligadas a estrutura da fibra, atraindo íons de cálcio.

A contribuição das nanofibras no aumento da trabalhabilidade, resistência e durabilidade dos materiais de construção podem afetar a hidratação do cimento. Além disso, a adição de nanomateriais pode melhorar o desempenho do cimento consideravelmente. O alto desempenho de nanofibras atraiu pesquisadores para utilizá-las para obtenção de autocicatrização (HUSEIENA et al., 2019).

3.3.5 Autocicatrização por fibras de celulose

Segundo Pointot et al. (2015), a utilização de nanofibras de celulose no concreto no decorrer do processo de hidratação, a hidroxila OH^- e grupos carboxila COOH^- na superfície das fibras de celulose podem reagir com íons de cálcio Ca^{2+} e assim retardar a hidratação.

Toledo and Ghavami (1997) concluiu em sua pesquisa que fibras vegetais auxiliam no fechamento de fissuras. Constataram que adicionando-se fibras de coco e sisal à matriz cimentícia, as fissuras fecharam de forma mais rápida do que na matriz sem adição, mostrando o potencial das fibras na cicatrização.

Moreira et al. (2016) relataram que fibras de celulose favorecem a autocicatrização devido a formação de carbonato de cálcio ao longo da fibra, pois a presença dos íons de cálcio Ca^{2+} favorece esse processo. Com isso, o carbonato de cálcio que se forma ao longo da fibra de celulose irá selar a fissura e também funcionará como um reforço para o local.

A utilização da celulose apresenta inúmeras vantagens, pois é o composto orgânico de maior abundância na crosta terrestre, sendo o principal componente da biomassa (GUIMARÃES JUNIOR et al., 2015). As fibras celulósicas podem ser obtidas a partir de

diversas fontes, tais como: bactérias (GATENHOLM e KLEMM, 2010), cânhamo (DAI; FAN; COLLINS, 2013), bambu (GUIMARÃES JUNIOR et al., 2015), madeira (FONSECA et al., 2016), folhas de abacaxi (CHERIAN et al., 2011), bagaço de cana-de-açúcar (MANDAL e CHAKRABARTY, 2011), sisal (MORÁN et al., 2008), entre outros. Sendo que as propriedades das nanofibras vão variar quanto à matéria prima da qual foram obtidas. (SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005).

Entre outros fatores, a introdução de um agente biológico que pudesse produzir a celulose dentro das fissuras teria muitas vantagens devido à escala micro das fissuras (DU et al., 2019). O desenvolvimento da fibra no próprio local da fissura também facilitaria o processo de entrelaçamento da mesma com os cristais que irão se formar. E o desenvolvimento de um material de autocicatrização sustentável seria muito benéfico para tentar mitigar o impacto ambiental causado pela indústria cimentícia (HUSEIENA et al., 2019).

3.4 Oomiceto *pythium*

O gênero *Pythium* é considerado um dos mais importantes dentre os organismos zoospóricos, principalmente devido ao seu potencial parasítico em plantas de interesse econômico, causando normalmente apodrecimento de raiz, caule e frutos; podridão de sementes na pré-emergência e tombamento de plântulas na pós-emergência (VAN DER PLAATS-NITERINK, 1981). Cerca de 150 espécies são descritas para o gênero, 41 delas já relatadas no Brasil (MAIA et al., 2015), sendo a maioria cosmopolita e sapróbia em diferentes tipos de substratos, na água e no solo e/ou parasita em algas, crustáceos, outros fungos, plantas vasculares, mamíferos, e inclusive no homem (CALVANO et al., 2011; KAGEYAMA, 2014). *Pythium* é um gênero que inclui uma variedade de espécies encontradas em habitats terrestres e aquáticos, onde podem viver como saprófitas, parasitas de plantas, animais ou microparasitas.

O gênero foi estabelecido por Pringsheim, em 1858, e no esquema taxonômico atual é colocado no Reino *Stramenopila*, Filo *Oomycota*, Classe *Peronosporomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium*. A maioria dos oomicetos fitopatogênicos pertence a duas ordens dentro da classe dos *Peronosporomycetidae*, os *Peronosporales* e *Pythiales*. A ordem *Pythiales* inclui *Pythium*, *Phytophthora* e *Albugo*. As espécies de *Pythium* são eucariotos, organismos semelhantes a fungos que por muito tempo foram considerados pertencentes ao reino ‘Fungi’. Tanto oomicetos quanto fungos compartilham semelhanças.

Ambos têm crescimento filamentosos em seu estágio vegetativo, produzem esporos e têm um estilo de vida heterotrófico. Embora compartilhem essas semelhanças, são conhecidas diferenças importantes que os separam em diferentes Reinos, das quais se destaca que a parede celular de muitos oomicetos é composta de celulose, já a parede celular dos fungos é constituída por quitina (BURGOS-GARAY, 2013).

O *Pythium* está presente em todos os ecossistemas, possui rápido crescimento e elevada resistência, mesmo em ambientes mais agressivos (OLIVEIRA et al., 2021).

Tais características o fazem um promissor organismo para ser utilizado como agente cicatrizante de matriz cimentícia.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa, observou-se que o *Oomiceto Pythium* possui características singulares que o tornam apto para ser utilizado em materiais cimentícios, especialmente devido à sua alta disponibilidade, rápido crescimento e certa resistência ao pH alcalino. Essas propriedades tornam o *Pythium* spp. uma alternativa potencial para materiais de construção convencionais.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que o *Pythium aphanidermatum* apresenta uma promissora utilização como agente autocicatrizante em materiais cimentícios. Os dados aferidos foram surpreendentemente superiores às expectativas iniciais, evidenciando que o micro-organismo é efetivo em melhorar a resistência e durabilidade dos materiais.

Contudo, para que o uso do *Pythium aphanidermatum* em materiais cimentícios seja uma opção viável e sustentável, é fundamental que os estudos sejam continuados e aprimorados. É necessário desenvolver novas estratégias para melhorar a resistência do microrganismo ao pH alcalino, reduzir a quantidade de nutrientes necessários para o seu crescimento e diminuir o uso de aditivos que possam afetar seu desempenho. Além disso, é preciso aprofundar a compreensão dos mecanismos de interação entre o *Pythium aphanidermatum* e o cimento, para otimizar sua eficácia e aplicabilidade em diferentes tipos de materiais cimentícios.

Nesse sentido, a continuidade dos estudos é essencial para o avanço e a consolidação dessa tecnologia, possibilitando a sua utilização em escala comercial. A potencialidade do *Pythium aphanidermatum* como um agente de autocicatrização em materiais cimentícios pode trazer benefícios econômicos e ambientais significativos para a indústria da construção, contribuindo para a redução do uso de materiais tradicionais, com menor impacto ambiental e maior durabilidade dos materiais construtivos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4. ed. Volume 1, Piracicaba, SP: Ceres, 704p. 2011.
- BENTCHIKOU, M.; GUIDOUM, A.; SCRIVENER, K.; SILHADI, K.; HANINI, S. Effect of recycled cellulose fibres on the properties of lightweight cement composite matrix. **Construction and Building Materials, Guildford**, v. 34, n. 1, p. 451–456, Sept. 2012.
- BLAISZIK, B. J.; KRAMER, S. L. B.; OLUGEBEFOLA, S.C.; MOORE, J. S.; SOTTOS, N. R.; WHITE, S. R., Self-healing polymers and composites. **Annual Review of Materials Research**, p. 179–211, 2010.
- BURGOS-GARAY, M. L. Effect of heterotrophic bacterial communities on *Pythium* spp. in recycled irrigation water, **Ph.D. dissertation**, The Pennsylvania State University, 2013.
- CALVANO T.P.; BLATZ P.J., VENTO T.J.; WICKES B.L.; SUTTON D.A.; THOMPSON E.H.; WHITE C.E.; RENZ E.M.; HOSPENTHAL D.R. *Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma, **J. Clin. Microbiol**, v.49(10), p 3710- 3713, 2011.
- CHERIAN, B. M. et al. A novel method for the synthesis of cellulose nanofibril whiskers from banana fibers and characterization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 5617-5627, 2008.
- DAI, D.; FAN, M.; COLLINS, P. Fabrication of nanocelluloses from hemp fibers and their application for the reinforcement of hemp fibers. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 44, p. 192-199, Jan 2013.
- DE BELIE, N. Microorganisms versus stony materials: a love–hate. **Materials and Structures** v.43, p. 1191–1202, 2010.
- DE BELIE, N. ; VERSELDER, H. J.; DE BLAERE, B.; VAN NIEU-WENBURG, D.; VERSCHOORE, R. Influence of the cement type on the resistance of concrete to feed acids. **Cemend and Concrete Research**, v. 26, n. 11, p. 1717-1725, 1996.
- DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. **Ecological Engineering** v. 36, p. 118–136, 2010.
- DU, W.; YU, J.; GU, Y.; LI, Y.; HAN, X.; LIU, Q. Preparation and application of microcapsules containing toluene-di-isocyanate for self-healing of concrete. **Construction and Building Materials**, v. 202, p. 762-769, 2019.
- EDVARDSSEN, C. Water permeability and autogenous healing of cracks in concrete, **ACI Materials Journal**, p. 448-455, Julho/Agosto, 1999.
- FONSECA, C. S. et al. Micro/nanofibrilas celulósicas de eucalyptus em fibrocimentos estruturados. **Cerne**, Lavras, v. 22, p. 59-68, 2016.

GATENHOLM, P.; KLEMM, D. Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications. **MRS Bulletin**, Pittsburgh, v. 35, p. 211-213, Mar. 2010.

GONÇALVES, J.; EL-BAKKARI, M.; BOLUK, Y.; BINDIGANAVILE, V. Cellulose nanofibres (CNF) for sulphate resistance in cement based systems. **Cement and Concrete Composites**, v. 99, p.100–111, 2019.

GUIMARÃES JUNIOR, M. et al. Preparation of cellulose nanofibrils from bamboo pulp by mechanical defibrillation for their applications in biodegradable composites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 15, p. 6751-6768, 2015.

HEARN, N. Self-healing, autogenous healing and continued hydration: what is the difference? **Materials and Structures**, v. 31, p. 563-567, Outubro. 1998.

HOMMA, D.; MIHASHI, H.; NISHIWAKI, T. Self-healing Capability of fibre reinforced cementitious Composites. **Journal of Advanced Concrete Technology**, Tokyo, v. 7, n. 2, p. 217-228, 2009.

HUANG, H.; YE, G.; QIAN, C.; SCHLANGEN, E. Self-healing in cementitious materials: materials, methods and service conditions, **Construction and Building Materials**, v. 92, p. 499– 511, 2016.

HUSEIENA, G. F.; SHAHB, K. W.; SAMA, A. R. M. Sustainability of nanomaterials based self-healing concrete: An all-inclusive Insight. **Journal of Building Engineering**, v.23, p. 155–171, 2019.

KAGEYAMA K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of Pythium species, **J. Gen. Plant Pathol**, v.80(4), p.314-326, 2014.

LI, V. C.; WU, C.; WANG, S.; OGAWA, A.; SAITO, T., Interface tailoring for strain-hardening polyvinyl alcohol - engineered cementitious composites (PVA-ECC) **ACI Mater. J.**, 99 (5) , pp. 463-472, 2002.

MAIA, L. C. et al., Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia (Impresso)** v. 64, p.1033-1045, 2015.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, n. 3, p. 1291-1299, Aug. 2011.

MORÁN, J. I. et al. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose, Bucharest**, v. 15, p. 149-159, 2008.

MOREIRA, T.; VISAR, K.; FERREIRA, S.; FERRARA, L.; SILVA, F.; ROMILDO, T., F. Self Healing Assessment under tensile loads of ultra high performance fiber reinforced concrete (UHPFRC), **9th RILEM International Symposium on Fiber Reinforced Concrete - BEFIB** 19-21 September 2016.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. Monograph on the genus Pythium. **Stud. Mycol.** v. 21: p.1-242, 1981.

OLIVEIRA, L.S.S.; JUNG, T.; MILENKOVIĆ, I.; TARIGAN, M.; HORTA JUNG, M.; LUMBANGAOL, P.D.M.; SIRAIT, B.A.; DURÁN, A. Damping-off, root rot and wilting caused by *Pythium myriotylum* on *Acacia crassicarpa* in Sumatra, Indonesia. **For. Pathol**, 51. in press, 2021.

POINOT, T.; BARTHOLIN M. C.; ALEXANDRE GOVIN A.; GROSSEAU P., Influence of the polysaccharide addition method on the properties of fresh mortars. **Cement and Concrete Research**, v. 70, p. 50–59, 2015.

QURESHI, T.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Autogenous self- healing of cement with expansive minerals-I: Impact in early age crack healing. **Construction and Building Materials**, v. 192, p. 768-784, 2018.

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

RILEM. Self-healing phenomena in cement-based materials 2005. (**Technical Committee 221- SHC**). Disponível em: <http://www.rilem.net/gene/main.php?base=8750&gp_id=228>. Acesso em 25 Junho 2019.

ROOIJ M., VAN TITTELBOOM K., BELIE N., SCHLANGEN E. Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials: **State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee**, Springer, 2013.

SAMIR, M.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, n. 2, p. 612-626, 2005.

SCHREIBEROVÁ, C.; BÍLÝ, P.; FLÁDR, J.; ŠEPS, K.; CHYLÍK, R.; TRTÍK T. Impact of the self-healing agent composition on material characteristics of bio-based self-healing. **Case Studies in Construction Materials**, v. 11, e00250, 2019.

SISOMPHON, K.; COPUROGLU, O.; KOENDERS, E. A. B. Self-healing of surface cracks in mortars with expansive additive and crystalline additive. **Cement & Concrete Composites** v. 34, p. 566–574, 2012.

TOLEDO F. R. D.; GHAVAMI, K. Comportamento em compressão de argamassas reforçadas com fibras naturais, I. Relação tensão-deformação experimental e processo de fratura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental*, Campina Grande, v. i, p.79-88, 1997.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N. Self-Healing in Cementitious Materials-A Review. **Materials** v. 6, p. 2182-2217, Jun. 2013.

WANG, X.; FANG, C.; LI D., HAN, N., XING, F. A self-healing cementitious composite with mineral admixtures and built-in carbonate. **Cement and Concrete Composites** v. 92, p. 216–229, 2018.

WANG, J.; TITTELBOOM, K. V.; DE BELIE N.; VERSTRAETE, W. Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 26, n. 1, p. 532-540, Jan. 2012.

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

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

SCHROEDER, K.L.; MARTIN, F.N.; DE COCK, A.W.; LÉVÉSQUE, C.A; SPIES, C.F.; OKUBARA, P.A. & PAULITZ, T.C. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. **Plant Disease**, 97(1): 4-20, 2013.

SEGUNDA PARTE**ARTIGOS**

**ARTIGO 1 - EFEITO DO PH ALCALINO E DO CaCl_2 NO DESENVOLVIMENTO
DO *Pythium* spp. VISANDO SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTE DE
AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATRIZES CIMENTÍCIAS.**

(Artigo redigido conforme as normas da Revista Construction and Building Materials)

Efeito do pH alcalino e do CaCl₂ no desenvolvimento do *Pythium* spp. visando sua utilização como agente de autocicatrização em matrizes cimentícias

Laércio Mesquita Júnior^{a*}, Gabrielle Avelar Silva^a, Diego Borges Silva^a, Eduardo Hélio de Novais Miranda^a, Maria Alves Ferreira^a, Saulo Rocha Ferreira^a, Giovanni Francisco Rabelo^a

^aFederal University of Lavras – UFLA, University Campus, Doutor Sylvio Menicucci Av., POB 3037, Lavras, MG, Brazil: laerciomjr@gmail.com

* Autor correspondente

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH alcalino e do CaCl₂ no desenvolvimento do *Pythium* spp. com o intuito de promover a autocicatrização em matrizes cimentícias visto que sua parede celular é composta por celulose, e está além de atrair os ions Ca²⁺, que favorece a formação de CaCO₃, atuaria como reforço estrutural. O CaCl₂ foi utilizado para atenuar a inibição provocada por carboidratos que são utilizados como nutrientes (BD). Então é necessário que o *Pythium* spp. se desenvolva em meios com CaCl₂ e com pH alcalino, pois a matriz cimentícia é um ambiente básico (pH>10). Foi adotado 100% de BD para a concentração de 24g/L. A identificação da espécie foi obtida através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Com 100% de similaridade e 99,7% de identidade, foi determinado como *Pythium aphanidermatum*. Em relação ao CaCl₂, aos 7 dias, 0% e 25% de concentração obtiveram massa estatisticamente iguais. Aos 14 dias a massa se manteve constante até 150%. Foi constatado que se desenvolveu com aumento de biomassa em 7 e 14 dias até o pH10. As curvas de inibição mostram que 24g/L de BD é inapropriada para a utilização em matrizes cimentícias. O cálculo do índice de inibição para a concentração de 6g/L de BD obteve inibição baixa para as concentrações de 150%, 175% e 200%. Por conseguinte, a concentração mais apropriada para o meio é de 6g/L de BD com 150% de CaCl₂. A análise termogravimétrica (TG) e sua derivada (DTG) confirmaram que o *Pythium aphanidermatum* é composto por celulose. Todos esses fatores indicam o micro-organismo promissor como agente autocicatrizante.

Palavras-chave: Concreto. Autocicatrização. Nucleação. *Pythium aphanidermatum*.

1 INTRODUÇÃO

O concreto é um dos materiais mais utilizados na construção civil devido à sua disponibilidade, trabalhabilidade e resistência aos esforços de compressão [1]. Entretanto, no decorrer de sua vida útil, surgem fissuras devido a vários processos como: sobrecarga, dilatação térmica e fatores autógenos. Desta forma, são necessários reparos, pois essas podem comprometer a estabilidade da construção [2].

Caso o reparo não seja executado de forma adequada, pode ocorrer o colapso de toda estrutura [3]. Esses reparos precisam ser executados em curto período de tempo, pois a propagação das fissuras acelera o processo de degradação. Pelo fato de estarem em escala

micro ou por se encontrarem no interior da estrutura [4], torna-se necessária manutenção constante realizada por profissionais qualificados, o que gera custo financeiro [2].

Como alternativa foram desenvolvidos compostos cimentícios que possuam a propriedade de autocicatrização das fissuras, na qual o material apresenta a capacidade de se reparar sem que ocorra qualquer intervenção, conseqüentemente reduzindo ou até mesmo eliminando os custos de manutenção [3][5].

Os processos de autocicatrização desenvolvidos são classificados em autógenos e autônomos [6]. O processo autógeno ocorre devido às características intrínsecas dos materiais utilizados na matriz cimentícia, potencializando a hidratação residual dos grãos de cimento que ainda não foram hidratados e a carbonatação, que é a formação de carbonato de cálcio CaCO_3 devido a reação do hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 com o dióxido de carbono CO_2 presente na atmosfera, na presença de água [7][8]. Enquanto o processo autônomo depende de agentes que não fazem parte da composição normal do cimento [9].

O processo autônomo introduz na matriz elementos que não são usuais a mesma. E uma abordagem que mostra resultados muito promissores é a utilização de microrganismos que induzam o processo de autocicatrização. Um exemplo é a incorporação de esporos de bactérias específicas dentro da matriz cimentícia juntamente com nutrientes que promovam seu desenvolvimento. Ao surgir o processo de fissuração, ocorre também a penetração de água e oxigênio, fazendo com que os esporos germinem. Essas bactérias atuam como ponto de nucleação, fenômeno esse que consiste na atração de Ca^{2+} que acelera a precipitação de carbonato de cálcio CaCO_3 dentro das fissuras [10].

A captação de íons de cálcio Ca^{2+} também é observada em fibras de celulose quando utilizadas em matrizes cimentícias, [11]. Ferrara et al., 2014 [12] e Moreira et al. 2016[13] demonstraram que esse fenômeno presente em fibras de celulose possibilita a autocicatrização. Contudo, os estudos citados foram realizados com a fibra de celulose já presente na matriz cimentícia, ou seja, adicionada durante o processo de produção. Outra possibilidade que tornaria o processo de vedação da fissura mais eficiente seria sua utilização após o surgimento de fissuras, pois além de proporcionar o processo de carbonatação que irá formar o carbonato de cálcio CaCO_3 para a selagem da fissura, a fibra serviria como reforço no local, obtendo uma selagem mais eficiente e duradoura.

A utilização de um agente biológico que pudesse produzir a fibra de celulose dentro da fissura apresenta-se como um meio promissor, devido ao baixo custo financeiro e ambiental de obtenção da fibra [14][10] e podendo atingir as microfissuras, o que não é possível por

técnicas convencionais de reparos [2]. Durante o desenvolvimento do microrganismo pode se entrelaçar com os cristais recém-formados, tornando-se um reforço estrutural [10]. Entretanto, para que o uso do agente biológico seja viável, é necessário que apresente acelerado desenvolvimento e que também seja resistente ao ambiente básico, pois devido às reações químicas de hidratação do cimento o meio torna-se alcalino ($\text{pH}>8$) [15].

Para atender os aspectos supracitados, algumas características são necessárias aos microrganismos, como: produção de celulose, desenvolvimento acelerado e resistência a locais com pH alcalino. Dessa maneira, objetivou-se com esse trabalho, avaliar o desenvolvimento de *Pythium* spp. em meio alcalino, um microrganismo capaz de produzir celulose [16][17][18]. Além disso, verificar o crescimento em meios alternativos, visando sua utilização como agente biológico que possa promover autocicatrização em matrizes cimentícias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento e obtenção da cultura de *Pythium* sp.

O isolado foi obtido através do método de isca de pepino. Uma amostra do solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA) foi retirada, condicionada em recipientes e umedecida. Foram utilizados discos de pepino e colocados no solo por 2 dias (Figura 1). Um fragmento da cultura micelial foi transferido para placas de Petri contendo 20 ml de meio sólido de batata, dextrose e ágar (BDA) acrescido de antibiótico rifamicina (100mg/L). As placas foram mantidas a 28°C por 72 horas até que o organismo ocupasse toda a placa. Logo após foi retirado 1 disco de 5mm de diâmetro de micélio e transferido para uma nova placa de Petri contendo meio de BDA e antibiótico e incubadas a 28°C por aproximadamente 72 horas, até obtenção da cultura pura, adaptado [19].



Figura 1: Obtenção do isolado *Pythium* spp. com isca de pepino após 2 dias.

2.2 Identificação molecular do isolado de *Pythium*

A identificação da espécie de *Pythium* foi realizada utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando-se a região ITS (Internal Transcribed Spacer), incluindo a região 5.8s do rDNA e o gene mitocondrial correspondente à subunidade 2 do citocromo c oxidase (COXII) [20]. A obtenção de micélio para extração de DNA foi realizada segundo Myburg et al. (1999) [21]. Para isso, discos de micélios de 5mm de diâmetro foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer contendo meio de cultura líquido composto por batata e dextrose. Os frascos foram mantidos em agitador por uma semana até o crescimento do micélio. Posteriormente, o micélio foi retirado, filtrado e seco em papel filtro e em seguida triturado em nitrogênio líquido (Figura 2-a).



Figura 2: a-Trituração do *Pythium spp.* em nitrogênio líquido; b-Nanodrop Thermo Scientific 2000c.

Para a extração de DNA foi utilizado o kit Wizard[®] Genomic DNA purification (Promega, Madison, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas por meio de gel de agarose e uso do equipamento Nanodrop Thermo Scientific 2000c (Figura 2-b).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas seguindo o método descrito por Glass e Donaldson (1995) e preparadas a um volume final de 25 μ l, utilizando o termociclador Techne Prime G (Figura 3-b). Foram amplificados a região ITS utilizando-se o par de primers UN-UP18S42 e UN-LO28S22 [22] e o gene COXII utilizando o par de primers FM58 e FM66 [23] (Figura 3-a).

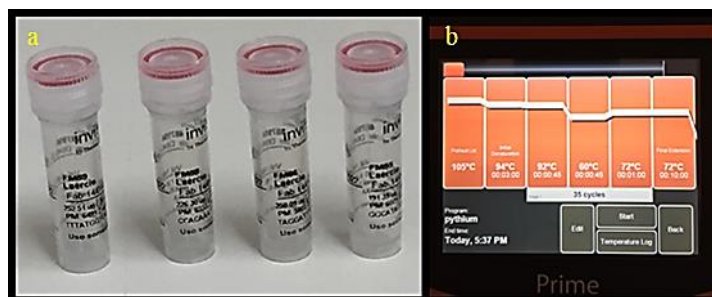


Figura 3: a-Primers utilizados; b-Tela de controle do termociclador Techne Prime G.Nanodrop.

Para a região ITS, a desnaturação foi realizada a 94°C por 3 minutos seguida de 35 ciclos a 92°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto com extensão final de 72°C por 10 minutos. Para o gene COXII realizou-se a desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos resultantes da amplificação foram avaliados por meio de eletroforese, utilizando gel de agarose a 1% com adição de GelRed® (Figura 4-a). As bandas foram visualizadas por meio do fotodocumentador de luz ultravioleta DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro (Figura 4-b). A purificação dos produtos de PCR e o sequenciamento foram realizados pela empresa Macrogen Company korea (Figura 4-c).



Figura 4: a- Cuba de eletroforese, utilizando; b- Fotodocumentador de luz ultravioleta DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro; c- DNA enviado a Macrogen.

Os eletroferogramas gerados foram analisados e as sequências editadas manualmente, quando necessário, utilizando o software SeqAssem [24].

Após a edição, as sequências foram analisadas por meio do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>), sendo comparadas com outras sequências depositadas no NCBI/GenBank,

2.3 Variação do pH

Foram preparados meios de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer (250ml) contendo líquido composto por 2.4g de BD (batata-dextrose), dissolvidos em 100ml de água. Os meios foram autoclavados e em seguida o meio de cultura foi alterado, utilizando hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 . Com a adição progressiva para obter um aumento de pH, sendo aferido por pHmetro de bancada KASVI K39-1410A, até atingir os valores previamente estabelecidos. Os tratamentos utilizados foram: meio de cultura sem alteração com hidróxido de cálcio C (pH5.6), pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 e pH 10. Após o processo de alteração do pH, o *Pythium* spp. foi transferido para os meios com diferentes pHs. Foram retirados três discos com diâmetro de 5mm do meio sólido de BDA e colocados nos frascos. Foram preparados quatro frascos para cada tratamento e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12h por 7 dias, adaptado [25] (Figura 5-a).



Figura 5: a- pHmetro montado no Fluxo; b- Balança digital de precisão.

2.4 Variação da concentração de CaCl_2

Foram preparados meios de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer (250ml) contendo líquido composto por 2.4g de BD (batata-dextrose) dissolvidos em 100ml de água.

Para o preparo dos meios com variações da concentração de CaCl_2 foi adotado como parâmetro a relação com a quantidade de BD utilizadas no meio que é indicada pelo fabricante. Ficou estabelecido 100% para a concentração de 24g/L. Com isso, as concentrações utilizadas foram: 25%(6g/L); 50%(12g/L); 75%(18g/L); 100%(24g/L); 125%(30g/L); 150%(36g/L); 175%(42g/L); (200%(48g/L). Foi transferido três discos de micélio de *Pythium* spp. com diâmetro de 5mm do meio sólido (BDA) e colocados nos

frascos. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Após a transferência dos discos de micélio, os frascos permaneceram incubados a 25°C com fotoperíodo de 12h por 7 e 14 dias, adaptado [26].

2.5 Determinação da massa de nutriente BD a ser utilizada no meio de cultura.

Para o preparo dos meios com variações da concentração de BD foi adotado como parâmetro a relação com a quantidade de BD recomendado pelo fabricante HIMEDIA (24g/L). Foi estabelecido C para a concentração de 24g/L. Com isso, as concentrações utilizadas foram: T3(6g/L); T2(12g/L); T1(18g/L) e transferidos três discos de micélio de *Pythium* spp. com diâmetro de 5mm do meio sólido (BDA) e colocados nos frascos. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Após a transferência dos discos de micélio, os frascos permaneceram incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12h por 7 e 14 dias. A avaliação do desenvolvimento se deu pela mensuração da quantidade de biomassa micelial produzida em cada meio.

2.6 Determinação da concentração de CaCl₂.

Foram realizados testes com a concentração de BD de 24g/L e 6g/L, 200 gramas de cimento Portland CP V-ARI/Plus e 90 ml de água. Após homogeneizados, durante 5 minutos, esses materiais foram inseridos no interior de caixas de isopor com dimensões internas de 80 x 97 x 56 mm (comprimento x largura x altura, respectivamente) e espessura das paredes de 7.5 mm; as quais estavam previamente forradas com papel alumínio. Dentro de cada caixa de isopor inseriu-se um sensor conectado a um Datalogger, no qual os dados gerados foram armazenados em intervalos de um segundo durante 24 horas. Cada caixa de isopor, com a mistura e o sensor para medição da temperatura, foi acondicionado em uma caixa térmica forrada com lã de vidro (Figura 6). Em seguida, a aquisição de dados foi iniciada para posterior análise. Adaptado [27].

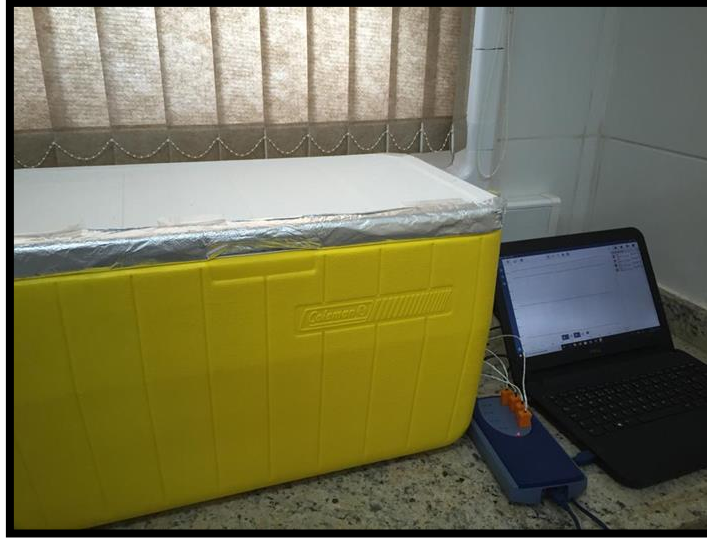


Figura 6: Equipamento para determinar a inibição.

Os índices de inibição foram calculados conforme a equação descrita na Equação (1) [28].

$$I = 100 \left[\left(\frac{T_2 - T'_2}{T_2} \right) \left(\frac{T_2 - T'_2}{T_2} \right) \left(\frac{S_2 - S'_2}{S_2} \right) \right] \quad (1)$$

Onde: I = índice de inibição; t₂ = tempo para se alcançar a temperatura máxima de hidratação da mistura cimento-madeira-água; t'₂ = tempo para se alcançar a temperatura máxima de hidratação da mistura cimento-água; T₂ = Temperatura máxima atingida pela mistura cimento-madeira-água; T'₂ = Temperatura máxima atingida pela mistura cimento-água; S₂ = Variação máxima da temperatura por hora para mistura cimento-madeira-água; S'₂ = Variação máxima da temperatura por hora para mistura cimento-água.

Tabela 1: Índice de inibição utilizado [28].

Índice de inibição (%)	Classificação
I < 10	Inibição baixa
I = 10 – 50	Inibição Moderada
I = 50 – 100	Inibição Alta
I > 100	Inibição Extrema

2.7 Avaliação da Biomassa

A avaliação o desenvolvimento de *Pythium* spp. foi obtido através da quantidade de biomassa micelial produzida em cada meio. Para isso, a colônia foi desidratada em estufa com circulação e renovação de ar a 40 °C por 48 horas até obter massa constante. A massa micelial

seca foi mensurada com auxílio de balança de precisão. Os dados foram anotados e processados, adaptado [29], (Figura 5-b).

2.8 Análise térmica por termogravimetria (TGA/DTG)

As análises térmicas foram realizadas em 5 tratamentos diferentes, afim analisar a influência CaCl_2 na estrutura do *Pythium* sp. Para preparo dos meios com variações da concentração de CaCl_2 foi adotado como parâmetro a relação com a quantidade de BD utilizadas no meio que é indicada pelo fabricante. Ficou estabelecido 100% para a concentração de 24g/L. Com isso, as concentrações utilizadas foram: T1(0%); T2(25%); T3(50%); T4(100%); T5(150%); T6(200%). Foram realizadas em um analisador térmico modelo TGA Q500 (TA Instruments ®) com taxa de aquecimento de 10°C/min) de 20°C a 1000°C, adaptado [30].

2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram retiradas amostras de hifas de *Pythium* sp. após 14 dias de desenvolvimento em meio de cultura sólido de BDA. As micrografias de MEV foram obtidas no MEV-FEG de Ultra-alta Resolução com uma voltagem de 20keV localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.10 Análise estatística

Para avaliar a massa seca produzida, os dados foram submetidos à análise de variância e o teste de Scott Scott-Knott a 5% de significância e avaliados, estatisticamente, com o uso do software Sisvar.

3. Resultados e discussão

As bandas foram visualizadas por meio de análise em fotodocumentador. Indicando a amplificação da região ITS e o gene COXII [22][23] como pode ser observado na Figura 7.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pythium aphanidermatum isolate SG-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed sp...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	865	MT558009.1
Pythium aphanidermatum isolate WY-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed sp...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	867	MT558010.1
Pythium aphanidermatum strain Soundharya_au_01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal t...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	824	MT547907.1
Pythium aphanidermatum isolate K017R internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	773	MT534283.1
Pythium aphanidermatum isolate K013 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, c...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	767	MT534279.1
Pythium aphanidermatum isolate K006R(2) internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA ge...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	767	MT534271.1
Pythium aphanidermatum isolate K006R small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	815	MT534270.1
Pythium aphanidermatum KF1 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	806	LC514600.1
Pythium aphanidermatum isolate K005R small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	806	MT533460.1
Pythium aphanidermatum isolate K003R small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	819	MT533280.1
Pythium aphanidermatum isolate K002 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed sp...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	794	MT533253.1
Pythium aphanidermatum isolate Kh005 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	703	MT531538.1
Pythium aphanidermatum isolate BN014 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	756	MT527964.1
Pythium aphanidermatum isolate RN015 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	805	MT526789.1
Pythium aphanidermatum isolate RN013R small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribe...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	820	MT526682.1
Pythium aphanidermatum isolate RN012P internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene...	Pythium aphanid...	1238	1238	100%	0.0	99.70%	766	MT526249.1

Figura 9: Imagem da análise do resultado no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>).

O *Pythium aphanidermatum* se desenvolve em todo o mundo, destacando-se como um dos patógenos mais comuns e destrutivos em cultivos hidropônicos e que afeta uma ampla gama de hospedeiros ao redor do planeta. Esta espécie é uma das mais estudadas deste gênero [31]. Pode crescer em temperaturas superiores a 40°C, desta forma o controle desta espécie é um desafio, especialmente nas épocas quentes do ano, já que é resistente a diversos tipos de fungicidas [32][33][34].

A avaliação da biomassa de *Pythium aphanidermatum*, mensurada após 7 dias obteve maior valor no tratamento de referência (sem adição de CaCl₂) 0.36g, porém estatisticamente igual ao tratamento com 25% que foi de 0.34g. Os valores obtidos nos tratamentos com 50%(0.27g), 75%(0.28g), 100%(0.27g) e 125%(0.21g) não se diferiram estatisticamente. O menor valor encontrado foi na concentração de 200%(0.02g), seguido de 175%(0.06g) e 150%(0.16g). Na Figura 10 constatou-se que quanto menor a biomassa micelial, maior é o aumento da concentração de CaCl₂, porém na concentração de 200%, ocorreu o desenvolvimento, mesmo que de uma maneira reduzida.

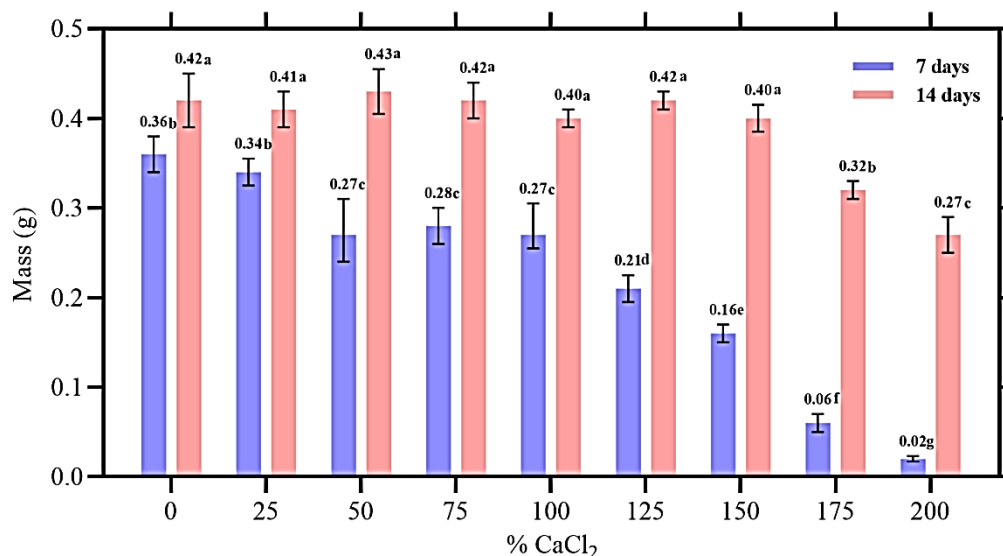


Figura 10: Biomassa micelial após 7 e 14 dias em meio com concentração de CaCl₂ proporcional a quantidade de nutriente. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de significância.

Entretanto, na avaliação de 14 dias, o maior valor encontrado foi para a concentração de 50%(43g). Contudo, foi estatisticamente igual as concentrações de 0%(0.41g), 25%(0.41g), 75%(0.42g) 100%(0.40g), 125%(0.42g) e 150%(0.40g). Em seguida, também registraram valores estatisticamente iguais as concentrações de 175%(0.32g) e com o menor valor a concentração de 200%(0.27g). Constatou-se que ocorreu uma tendência de diminuição apenas nas concentrações com maiores proporções de CaCl₂, 175% e 200% (Figura 10).

Com a análise dos resultados de 7 dias, verifica-se que inicialmente existe uma diminuição do desenvolvimento de *Pythium aphanidermatum*, com o incremento da quantidade de CaCl₂, contudo após 14 dias verificamos que até a concentração de 150% foram alcançados valores estatisticamente iguais. Já as concentrações de 175% e 200%, apesar de terem obtidos os menores valores dos testes após 14 dias, estes foram significativamente superiores aos valores dos testes de 7 dias.

Segundo Dullah et., al 2017 [35] a quantidade de CaCl₂ necessária para atenuar os efeitos da inibição causada por materiais biológicos pode variar entre 0.5 a 5%, ao qual seriam os valores aproximados entre (8 a 80g/L). Omoniyi e Akinyemi, 2013[36] relatam que o valor ideal de CaCl₂ para atuar como aditivo de acelerador de cura em concretos reforçados por fibra vegetal seria 3%, que é aproximadamente 48g/L. Então no tratamento de 200% seria o valor ideal de CaCl₂ para utilização na matriz cimentícia.

Com relação a variação do pH da solução, no ensaio de 7 dias, o meio de controle, com pH de 5.6, sem alteração, obteve o maior valor 0.36g e as concentrações com (0.12g) foi

o que atingiu menor valor de biomassa, conforme (Figura 11). Já o pH11 não ocorreu desenvolvimento do *Pythium aphanidermatum*.

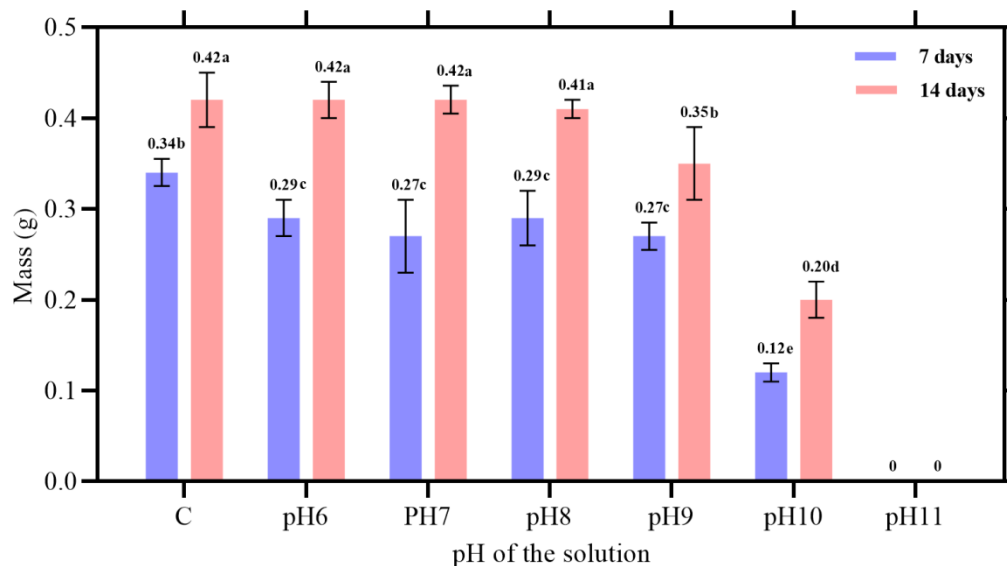


Figura 11: Biomassa micelial após 7 e 14 dias em meio com variação de pH. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de significância.

Dentre os que ocorrerem desenvolvimento ainda obtém menor valor o meio com pH10(0.20g), nas demais concentrações, pH9(0.40g), pH8(0.41g), pH7(0.42g), PH6(0.42g) e controle (0.42g), foram encontrados valores estatisticamente iguais, (Figura 11). Os resultados encontrados nos ensaios com variação do pH de 7 e 14 dias, teve comportamento similar ao encontrado na variação de CaCl_2 , onde, as soluções com pH6, pH7, pH8 e pH9 tiveram um crescimento retardado no início, mas aos 14 dias igualaram o crescimento, e o pH10 mesmo não igualando atingiu um crescimento significativo. Apenas no pH11 não foi possível observar nenhum desenvolvimento.

O pH ótimo para o desenvolvimento do *Pythium aphanidermatum* é entre 5.5 e 6. Entretanto, relatam que é possível o seu desenvolvimento até pH10 [37][38]. A matriz cimentícia possui pH em torno de 13, porém em processos de fissuração, devido principalmente a entrada de água, esse pH diminui para valores entre 8 e 10 [39][40].

As variações de massa em relação a quantidade de BD na solução, conforme esperado, encontraram o valor máximo de C em 7 dias (0.35g) e 14 dias com 0.43g [41]. Entretanto foi estatisticamente igual em 7 dias com T1(0.33g) e em 14 dias 0.42g. O tratamento T3, em 7 e 14 dias, 0.21g e 0.35g. Com isso o valor de 14 dias igualando ao C em 7 dias. Então a redução

a 25% da massa de BD significou uma redução no desenvolvimento micelial em 60% aos 7 dias e 81.4% aos 14 dias, (Figura 12).

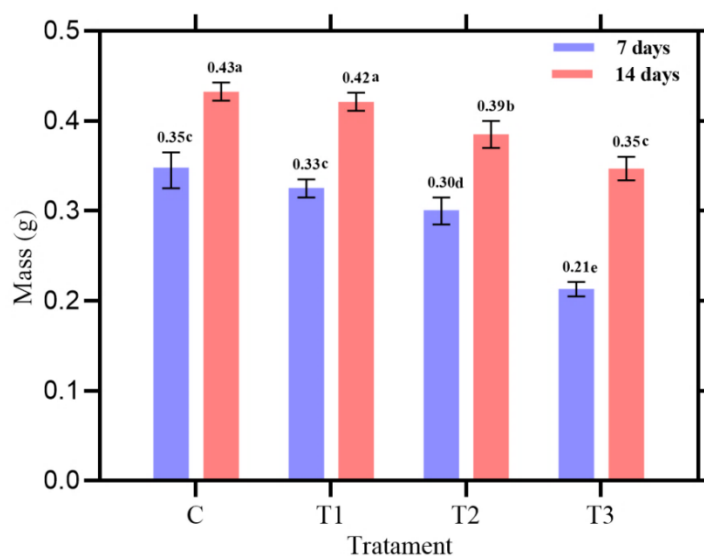


Figura 12: Biomassa micelial após 7 e 14 dias com variação de BD. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de significância.

Ao observar a curva de hidratação da pasta com solução de 24 g/L de BD (Figura 13), há apenas a presença de um pico principal, conforme descrito por Castro et al., 2013 [42]. A não ocorrência de pico secundário, indica que não houve a formação do C-S-H, que é o responsável pela resistência mecânica da matriz cimentícia, tornando assim, a solução inapropriada para a utilização com materiais à base de cimento [43]. Tal fato pode ser observado em todos os tratamentos, mesmo com o aumento progressivo da adição de CaCl_2 . Tal fato não foi observado em solução de 6 g/L de BD (Figura 14). Onde se observa a ocorrência da formação de picos, indicando que ocorreu hidratação da pasta.

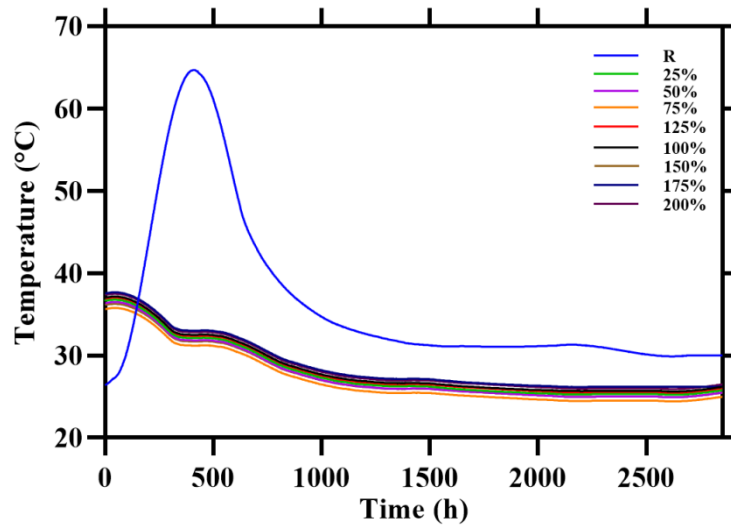


Figura 13: Curva de hidratação da pasta de cimento com 24g/L de BD com adição de CaCl_2 .

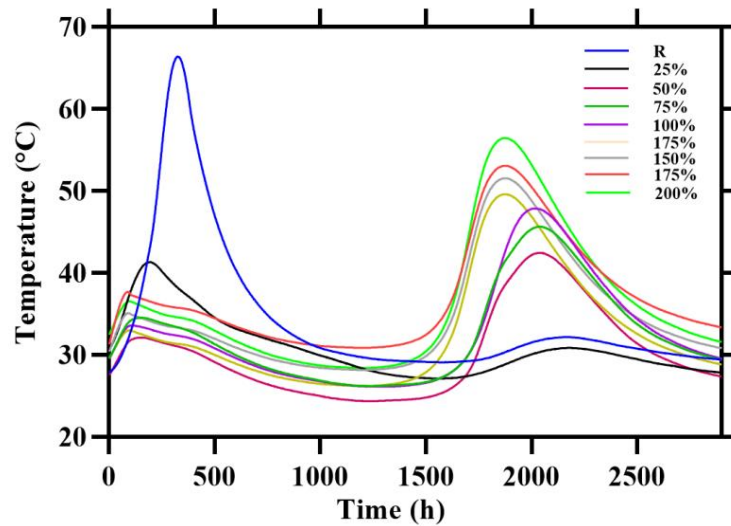


Figura 14: Curva de hidratação da pasta de cimento com 6g/L de BD com adição de CaCl_2 .

Os valores obtidos do índice de inibição para os tratamentos com 150%, 175% e 200% foram estatisticamente iguais. Com valores inferiores a 10% obtiveram a classificação de Inibição Baixa. Os demais Tratamentos foram classificados como Inibição Moderada, sendo que o de 25% ficou mais próximo do limite superior da classificação.

Tabela 2: Índice de inibição da pasta de cimento com 6g/L de BD com adição de CaCl_2 .

Tratamento	Índice de inibição (%)	Classificação
25%	46.45(2.11) a	Inibição Moderada
50%	21.17(1.35) b	Inibição Moderada
75%	18.22(1.15) b	Inibição Moderada
100%	15.46(0.97) c	Inibição Moderada
125%	11.91(0.54) d	Inibição Moderada
150%	8.05(1.89) e	Inibição Baixa
175%	6.60(0.74) e	Inibição Baixa
200%	4.95(0.31) e	Inibição Baixa

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de significância. Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

Não ocorreram mudanças significativas em relação aos tratamentos, o comportamento se mostrou o mesmo para todos, não evidenciando que ocorreu alteração em relação a composição química do material biológico analisado, devido a interferência concentração de CaCl_2 , como observado na (Figura 15-a e b).

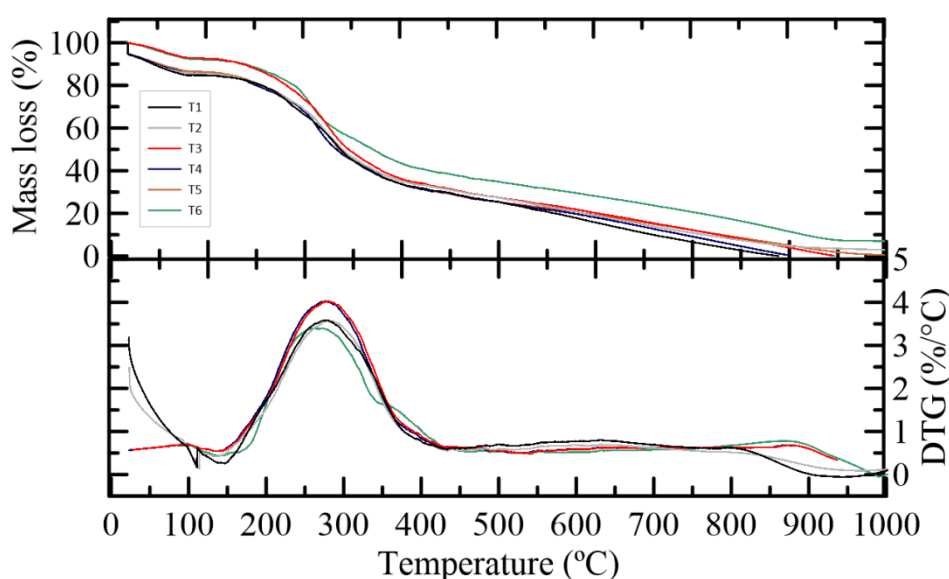


Figura 15: a-TG; b-DTG.

A degradação da hemicelulose começa aos 220°C e da celulose aos 250 °C. A lignina começa a ser degradada a uma temperatura mais baixa, 200°C [30]. A perda de massa entre 200 e 300°C pode ser considerada principalmente à decomposição das hemiceluloses. A perda de massa entre 300 e 400 °C é atribuída em maior proporção a celulose (250-350°C). A lignina (200-500°C), então pode-se afirmar que devido a degradação ocorreu até 400°C', que não

possuiu lignina, ou possui em quantidade insignificante. Em temperaturas acima de 400°C, ocorre oxidação e quebra do resíduo carbonizado em produtos gasosos de menor peso molecular, conforme [44].

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), observa-se na (Figura 16-a) presença de hifas asseptadas e tubulares (Figura 16-b e c), formando um micélio cenocítico (Figura 16-d e e), que são características morfológicas dos oomicetos [45]. As hifas principais têm até 10 µm de largura. Os zoósporos encistados têm um diâmetro de 12µm, similar ao encontrado por Burgos-Garay e Moorman, 2011 [34] (Figura 16-g).

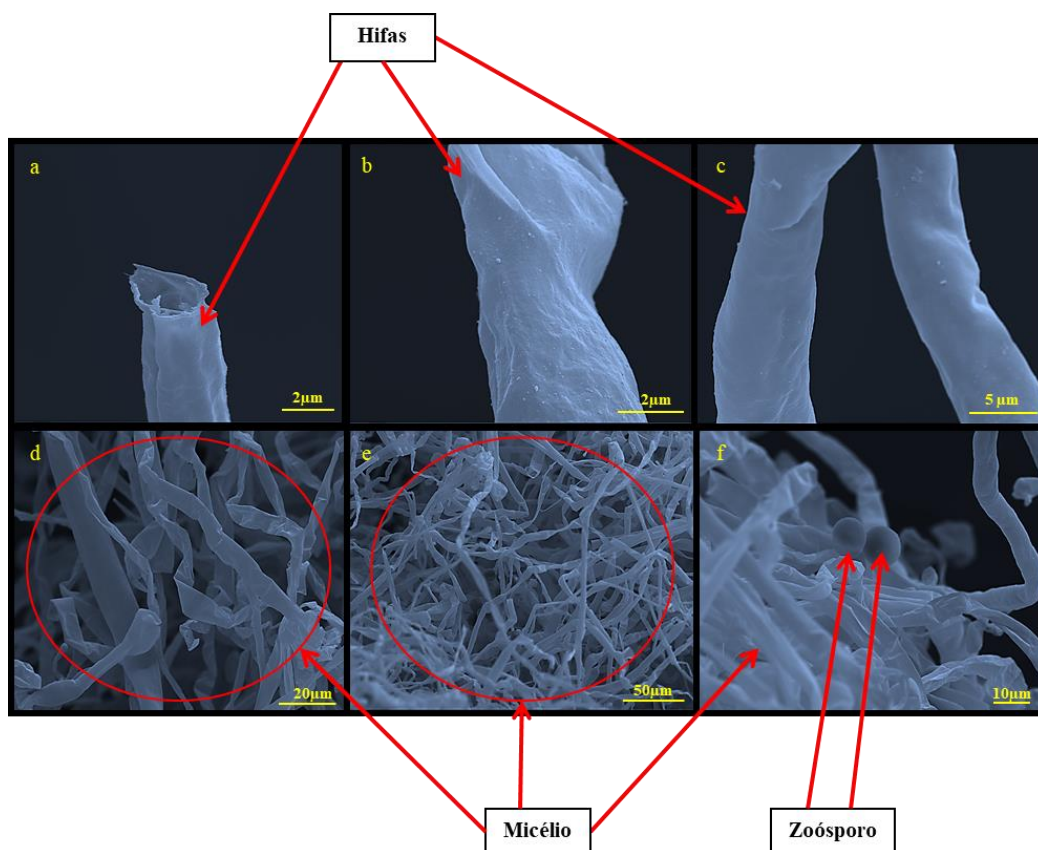


Figura 16: Imagem de MEV: a- Hifa; b- Hifa; c- Hifa; d- Micélio; e- Micélio; f- Zoósporo e Micélio.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

1. Com relação a identificação molecular da espécie. Foi identificado *Pythium aphanidermatum*, possuindo 100% de similaridade e 99,7% de identidade com outras sequências da espécie depositadas no Genbank nas regiões amplificadas.

2. O desenvolvimento em meio com concentrações de CaCl₂ em proporção a quantidade de BD. A biomassa das concentrações se iguala até 150%, após 14 dias, e as concentrações de 175% e 200% diminuem significativamente a diferença em relação a 7 dias.

3. Em relação ao pH, verificou-se que até o pH9 não obteve diferença significativa após 14 dias, e o pH10 atingiu 50% da biomassa em relação aos demais.

4. A análise de TG/DTG evidenciou a presença significativa de celulose na composição química da estrutura do *pythium*.

5. A concentração de 6g/L de BD foi a melhor concentração avaliada, pois ocorreu desenvolvimento significativo do *Pythium* e foi classificado como Inibição Baixa com as concentrações de 150% a 200% de CaCl₂.

6. Com os resultados obtidos pode ser possível o desenvolvimento do *Pythium aphanidermatum* em matriz cimentícia com o intuito de ser um agente biológico que induza autocicatrização acelerada.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Agência Federal de Apoio e Avaliação da Educação de Pós-Graduação (CAPES), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos estudantes, técnicos e professores dos Laboratórios de Biologia Molecular, Materiais de Construção Civil e UEPAM da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela disponibilidade e auxílio na realização de análises.

6. REFERÊNCIAS

[1] QURESHI, T.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Autogenous self-healing of cement with expansive minerals-I: Impact in early age crack healing. *Construction and Building Materials*, v. 192, p. 768-784, 2019.

[2] DU, W.; YU, J.; GU, Y.; LI, Y.; HAN, X.; LIU, Q. Preparation and application of microcapsules containing toluene-di-isocyanate for self-healing of concrete. *Construction and Building Materials*, v. 202, p. 762-769, 2019.

[3] LI, V. C.; WU, C.; WANG, S.; OGAWA, A.; SAITO, T., Interface tailoring for strain-hardening polyvinyl alcohol - engineered cementitious composites (PVA-ECC) *ACI Mater. J.*, 99 (5), pp. 463-472, 2019.

[4] WANG, X.; FANG, C.; LI D.; HAN, N.; XING, F. A self-healing cementitious composite with mineral admixtures and built-in carbonate. *Cement and Concrete Composites* v. 92, p. 216–229, 2018.

- [5] JIANG, Z.; LI W.; YUAN, Z., Influence of mineral additives and environmental conditions on the self-healing capabilities of cementitious materials, *Cem. Concr. Compos.* v.57 p.116–127, 2015.
- [6] QURESHI, T.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Autogenous self-healing of cement with expansive minerals-I: Impact in early age crack healing. *Construction and Building Materials*, v. 192, p. 768-784, 2018.
- [7] OLIVEIRA, A.S.; GOMES, O.F.M.; FERRARA, L.; FAIRBAIRN, E.M.R.; TOLEDO FILHO, R.D. An overview of a twofold effect of crystalline admixtures in cement-based materials: from permeability-reducers to self-healing stimulators, *Journal of Building Engineering*, v.41, 2021
- [8] DONG, B. et al. Self-healing features in cementitious material with urea–formaldehyde/epoxy microcapsules. *Construction and Building Materials*, v. 106, p. 608–617, mar. 2016.
- [9] ROOIJ M., VAN TITTELBOOM K., BELIE N., SCHLANGEN E., *Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials: State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee*, Springer, 2013.
- [10] HUSEIENA, G. F.; SHAHB, K. W.; SAMA, A. R. M., Sustainability of nanomaterials based self-healing concrete: An all-inclusive Insight. *Journal of Building Engineering*, v.23, p. 155–171, 2019.
- [11] GONÇALVES, J.; EL-BAKKARI, M.; BOLUK, Y.; BINDIGANAVILE, V. Cellulose nanofibres (CNF) for sulphate resistance in cement based systems. *Cement and Concrete Composites*, v. 99, p.100–111, 2019.
- [12] FERRARA, L.; KRELANI, V.; GEMINIANI M.; GORLEZZA R., Self healing of high performance fibre reinforced cementitious composites. In: *Improving performance of concrete structures. Proc. 4th Intl. fib Congress 2014 Mumbai, India*, v.8, p. 883–887, 2014.
- [13] MOREIRA, T.; VISAR, K.; FERREIRA, S.; FERRARA, L.; SILVA, F.; ROMILDO, T., F. Self Healing Assessment under tensile loads of ultra high performance fiber reinforced concrete (UHPFRC), 9th RILEM International Symposium on Fiber Reinforced Concrete - BEFIB 19-21 September 2016.
- [14] POINOT, T.; BARTHOLIN M.C.; ALEXANDRE GOVIN A.; GROSSEAU P., Influence of the polysaccharide addition method on the properties of fresh mortars. *Cement and Concrete Research*, v. 70, p. 50–59, 2015.
- [15] GONCALVES, J.; EL-BAKKARI, M.; BOLUK, Y.; BINDIGANAVILE, V., Cellulose nanofibres (CNF) for sulphate resistance in cement based systems. *Cem. Concr. Compos.* v.99, p.100–111, 2019.
- [16] SHABAN, R. M.; SAYED,; SHAIMAA A. M.; ABDELMOHSEN,; HANI, M. A.; ABDELZAHER,; MOHAMMED, A.; ELNAGHY; ASHRAF, A.; MOSTAFA,; FATEMAH, F.; AL-HARBI.; ASHRAF, M. M.,ABDELBACKI, Cellulose nanofibres (CNF) for sulphate resistance in cement based systems. *Cem. Concr. Compos.* v.99, p.100–111, 2019.

- [17] SALAHLIDIN, O. D.;VDHAFAER ALRAWI, D.; BUNIYA, K. H., Partial purification of pepsin enzyme produced by *Staphylococcus sciuri* and *Pythium* sp. using whey, MaterialToday Proceedings, Available online 11 May 2021.
- [18] LI, N.; ZHOU, Q.; CHANG, K.; YU, H.; HWANG, S.; CONNER, R. L., STRELKOV, S.L.; DEBRA L. MCLAREN, D. L.; TURNBULL, G. D., Occurrence, pathogenicity and species identification of *Pythium* causing root rot of soybean in Alberta and Manitoba, Canada Crop Protection, v.118, p.36-43, 2018.
- [19] KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W. & STALPERS, J.A., Dictionary of Fungi. 10th ed. Wallingford, UK: CAB International Publishing, p.396, 2008.
- [20] VETUKUR, R. R.; MASINI, L.; REBECCA MCDUGAL, R.; PANDA, P.; DE ZINGER, L.; BRUS-SZKALEJ, M.; LANKINEN, A.; LAURA J. GRENVILLE-BRIGGS, L. J. The presence of *Phytophthora infestans* in the rhizosphere of a wild *Solanum* species may contribute to off-season survival and pathogenicity, Applied Soil Ecology, v.148, 2020.
- [21] MYBURG, H.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Phylogeny of *Cryphonectria cubensis* and allied species inferred from DNA analysis. Mycologia, v.91, n.2, p.243-250, 1999.
- [22] GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, v.61, p.1323-1330, 1995.
- [23] PERNEEL, M.; TAMBONG, J. T.; ADIOBO, A.; FLOREN, C.; SABORI'O, f.; LE'VESTUE, A.; HO' FTE, M. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops, mycological Research, v.110, p.583 – 593, 2006.
- [24] AL-SHEIKH, H. Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field, Applied Soil Ecology, Saudi Journal of Biological Sciences, v. 17, p.347–352, 2010.
- [25] HEPPELLE D. SeqAssem - analysis and contig assembly of sequences. SequentiX-Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany, 2004.
- [26] ZITNICK-ANDERSON, K. K.; B.D. NELSON JR, B. D. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in north Dakota Plant Dis., v. 99, p. 31-38, 2015.
- [27] FARIA DL, SCATOLINO MV, LOPES TA, JUNIOR LM, MOTA GS, JUNIOR JBG, MENDES LM, SORIANO J (2020) Performance of glulam beams produced with free-formaldehyde adhesive and underexploited rubber wood treated with preservatives solutions of chromated copper borate and pyrethroids. J Adhes Sci Technol 34:1145–1162, 2020.
- [28] BRAHMIA, F.Z; HORVÁTH, P.G.; ALPÁR, T.L. Effect of pre-treatments and additives on the improvement of cement wood composite - a review. Cement-wood Composites.Bioresources, v.15, p .7288-7308, 2020.

- [29] ZITNICK-ANDERSON, K. K.; B.D. NELSON JR, B. D. Identification and pathogenicity of *Pythium* on soybean in north Dakota Plant Dis., v. 99, p. 31-38, 2015.
- [30] D.M. DOS SANTOS, A.L. BUKZEM, D.P.R. ASCHERI, R. SIGNINI, G.L.B. DE AQUINO, Microwave-assisted carboxymethylation of cellulose extracted from brewer's spent grain, Carbohydrate Polymers, v. 131, p. 125-133, 2015.
- [31] KAGEYAMA, K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. Journal of General Plant Pathology, v.80, n.4, p.314-326, 2014.
- [32] A. JEEVALATHA, FATHIMATH ZUMAILA, C.N. BIJU, K.C. PUNYA, Duplex recombinase polymerase amplification assay for simultaneous detection of *Pythium* spp. And *Ralstonia pseudosolanacearum* from ginger rhizomes, Crop Protection, Volume 161, 106057, 2022.
- [33] SIQIAO CHEN, PAUL DALY, DONGMEI ZHOU, JINGJING LI, XIAOYU WANG, SHENG DENG, HUI FENG, CHUNTING WANG, TAHA MAJID MAHMOOD SHEIKH, YIFAN CHEN, TAIQIANG XUE, FENG CAI, CHRISTIAN P. KUBICEK, LIHUI WEI, IRINA S. DRUZHININA, The use of mutant and engineered microbial agents for biological control of plant diseases caused by *Pythium*: Achievements versus challenges, Fungal Biology Reviews, v. 40, p. 76-90, 2022.
- [34] BURGOS-GARAY, M. L, MOORMAN G.W., Influence of *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare*, and *P. cryptoirregulare* on bacterial community in recycled irrigated water. Phytopathology, The American Phytopathological Society, v. 101, s. 23, 2011.
- [35] DULLAH, H.; ZAINAL KASAH, Z. A.; NIK MOHD ZAINI NIK SOH, N. M. Z. N.; MANGI, S., Compatibility improvement method of empty fruit bunch fibre as a replacement material in cement bonded boards: Materials Science and Engineering, v.271, 2017.
- [36] OMONIYI, T. E.; AKINYEMI, B. A., Hydration Characteristics of Bagasse in Cement-Bonded Composites, International Journal of Composite Materials, v.1, p.1-6, 2013.
- [37] ABDELZAHER, H. M. A.; ICHITANI, T.; ELNAGHY, M. A. Effect of temperature, hydrogen ion concentration and osmotic potential on zoospore production by three *Pythium* species isolated from pond water. Mycoscience, Vol. 35, N° 1, 1994.
- [38] CORRÊA, F. B.; VALENTE, J. S. S.; STOLL, F. E.; PEREIRA, D. I. B., Influência da concentração de íons de hidrogênio na viabilidade de zoósporos do oomiceto *Pythium* spp XII Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2011.
- [39] ZHANG, J. L.; R. S. WU, R. S.; LI, Y. M.; ZHONG, J. Y.; DENG, X.; LIU, B.; N. X. HAN, N. X.; XING, F., Screening of bacteria for self-healing of concrete cracks and optimization of the microbial calcium precipitation process, Appl Microbiol Biotechnol, v.100, p.6661–6670, 2016.
- [40] QIANA, C.; ZHANGA, Y.; XI, Y., Effect of ion concentration in crack zone on healing degree of microbial self-healing concrete, Construction and Building Materials, v.286, p. 2021

- [41] C.C. APARECIDO, C.CAMILO*, R.S. VAZ LOBO, vação de Divulgação técnica, Preservação de Pythium e Phytophthora a -80° C. *Biológico*, São Paulo, v.75, n.1, p.5-10, jan./jun., 2013.
- [42] CASTRO, V. G.; AZAMBUJA, R. R.; BILA, N. F.; PARCHEN, C. F. A.; SASSAKI, G. L.; IWAKIRI, S. Correlation between chemical composition of tropical hardwoods and wood-cement compatibility. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 38, n. 1, p. 28-34, 2018.
- [43] CASTRO, V. G. Avaliação da compatibilidade madeira-cimento. In: *Compósitos madeira-cimento: um produto sustentável para o Futuro* [online]. Mossoró: EdUFERSA, pp. 39-60, 2021.
- [44] WANG, J., MINAMI, E., ASMADI, M. Effect of delignification on thermal degradation reactivities of hemicellulose and cellulose in wood cell walls. *J Wood Sci* 67, 19, 2021.
- [45] BARBOZA, E. A., Diversidade de Pythium e Phytopythium associados a hortaliças e plantas invasoras no Brasil, sensibilidade de isolados a mefenoxam e gama de hospedeiras. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA UTILIZAÇÃO DO *Pythium aphanidermatum* COMO AGENTE BIOLÓGICO DE AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATRIZES CIMENTÍCIAS.

(Artigo redigido conforme as normas da Revista Construction and Building Materials)

Avaliação experimental da utilização do *Pythium aphanidermatum* como agente de autocicatrização de matrizes cimentícias

Laércio Mesquita Júnior^{a*}, Gabrielle Avelar Silva^a, Diego Borges Silva^a, Maria Alves Ferreira^a, Saulo Rocha Ferreira^a, Giovanni Francisco Rabelo^a

^aFederal University of Lavras – UFLA, University Campus, Doutor Sylvio Menicucci Av., POB 3037, Lavras, MG, Brazil: laercomjr@gmail.com

* Autor correspondente

Resumo: Este estudo avaliou a utilização do *Pythium aphanidermatum* como agente biológico para promover a autocicatrização em matrizes cimentícias. O material autocicatrizante foi preparado e inoculado em fissuras induzidas em corpos prova de argamassa com relação a/c 0,3, após 14 dias de sua produção. Fissuras produzidas por lâmina metálica serrilhada de 0,3 mm, para analisar a evolução da vedação em 3, 7, 28 e 56 dias. Corpos de prova com adição de 1% de fibras de polipropileno, foram fissurados em ensaio de flexão de 3 pontos. Os métodos utilizados para mensurar eficiência da vedação foram: recuperação de área (RA), Absorção de água (AA), recuperação de carga, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise (EDS). Realizados em 7, 28 e 56 dias após fissuração. A vedação foi constatada em 3 dias, com o desenvolvimento do agente biológico e formação de cristais ao qual evoluiu para total selagem em 56 dias. Todos os testes mostraram que o tratamento com o agente biológico foi eficiente em relação ao controle. Aos 56 dias obtiveram os melhores resultados com RC de 105%, 98,43% de RA e redução da absorção água. No MEV e EDS observou-se hifa carbonatada em conjunto a produtos da hidratação do cimento, com a indicação de Carbonatos, aluminatos e C-S-H na região da fissura. Esses resultados mostram que o *Pythium aphanidermatum* é um promissor agente de cicatrização cimentícia.

Palavras-chave: Concreto. Celulose. Carbonatação. Agente biológico.

1 INTRODUÇÃO

O conceito de autocicatrização em materiais de matriz cimentícia, ao qual se regenera sem intervenção humana, por si mesma, é promissor e progrediu significativamente nos últimos anos [1][2]. Isso se deve ao fato de que autocicatrização de fissuras pode prolongar a vida útil e reduzir os custos de manutenção das estruturas, o que melhora a sustentabilidade dos edifícios [3]. Os processos de autocicatrização podem ser classificados como autônomos e autógenos [4]. O mecanismo de ambos é gerar precipitação insolúvel na zona de fissura do concreto para selá-la [5].

A autocicatrização autógena é um processo de reparo intrínseco do material cimentício [6]. Esse reparo ocorre devido à hidratação residual. Os grãos de cimento que não foram hidratados, remanescentes, são hidratados devido à abertura de fissuras que possibilitam a

penetração de água [7]. Bem como à carbonatação, que é a formação de carbonato de cálcio CaCO_3 , devido a reação do hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 com o dióxido de carbono CO_2 presente na atmosfera, na presença de água [8][9].

Enquanto o processo autógeno é uma característica da matriz cimentícia, o processo autônomo depende de agentes que não fazem parte da composição normal do cimento [9]. Nesse processo, os agentes são encapsulados e incorporados na matriz. Esses agentes cicatrizantes são liberados quando a cápsula em que estão envoltos é rompida durante a fissuração [9][10]. Então quando liberados, promovem a reparação da fissura [11]. Os principais agentes que são utilizados para induzir o processo de autocicatrização são minerais e microbianos [12][13].

A tecnologia de agentes microbianos tem atraído grande atenção devido às suas características de sustentabilidade [14]. Dentre as quais se destaca utilização de bactérias como agente com a incorporação de esporos de bactérias na matriz cimentícia, juntamente com nutrientes que promovam seu desenvolvimento. Ao surgir o processo de fissuração, ocorre o rompimento da cápsula, e conseqüentemente a penetração da umidade e do oxigênio, fazendo com que os esporos germinem. Essas bactérias atuam como ponto de nucleação, fenômeno esse que consiste na atração de íons de cálcio Ca^{2+} , que acelera a precipitação de CaCO_3 dentro das fissuras [10][12][13].

A captação Ca^{2+} também é observada em fibras de celulose quando utilizadas em matrizes cimentícias [15]. Estudos recentes mostram que a celulose tem potencial utilização como agente autocicatrizante, pois pode promover a formação de CaCO_3 quando exposta no plano da fissura [12][16].

Entretanto, o que tornaria o processo de vedação mais eficiente, seria a utilização de um microrganismo, que assim como os esporos de bactérias, pudesse se desenvolver na fissura, pois além de proporcionar o processo de carbonatação para formação de CaCO_3 , a fibra de celulose serviria como reforço estrutural [14]. Ocasionalmente uma vedação mais completa, pois durante seu desenvolvimento atrairia íons Ca^{2+} , se entrelaçaria com os cristais recém-formados, tornando-se um reforço estrutural [17].

Em estudo recente, Mesquita Jr et al. [18], relatou a possibilidade da utilização do *Pythium aphanidermatum* como agente de indução de autocicatrização, pois apresenta relativa tolerância ao pH alcalino (desenvolveu-se até o pH 10) e também em se desenvolver em meios com concentração de CaCl_2 , que é empregado para atenuar na inibição causada pelo carboidrato que é aplicado como nutriente [19][20].

O gênero *Pythium* inclui mais de 200 espécies dispersa em quase todos ambientes [21]. São parasitas de plantas, animais e mais raro em humanos. No caso da espécie específica do estudo, não contamina o ser humano, são um problema para a indústria agropecuária, pois são de difícil controle devido ao seu rápido crescimento e resistência a vários fungicidas, isso se deve por sua membrana celular ser constituída por celulose [19][22]. Com sua classificação taxonômica atual pertencendo ao Reino *Chromista*, Filo *Oomycota* e Classe *Oomycetes* que compreende 13 ordens que incluem organismos presentes em diferentes ecossistemas [23].

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo, avaliar a utilização e o desempenho do *Oomiceto Pythium aphanidermatum* como agente de autocicatrização em matrizes cimentícias. Para tal, foi observado seu desenvolvimento em corpos de prova (cps) por 3, 7, 28 e 56 dias. A eficiência da vedação da fissura foi mensura por ensaio de absorção de água (AA), recuperação de carga (RC), recuperação de área (RA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (EDS).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do *Pythium aphanidermatum*

O material biológico isolado (Figura 1-a) estava armazenado na coleção micológica do laboratório de fitopatologia florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Fragmentos do micélio foram transferidos para placas de Petri com 20 ml de meio sólido BDA (batata-dextrose-ágar) e 0.25ml de antibiótico rifamicina SV sódica 10mg/mL, por 72 horas a 28°C. Em seguida foram retirados discos de 5mm de diâmetro de micélio e colocado 1 disco em 1 Erlenmeyer contendo 24g de batata-dextrose (BD) em 100 ml de água, a 28°C por 7 dias, adaptado [20].

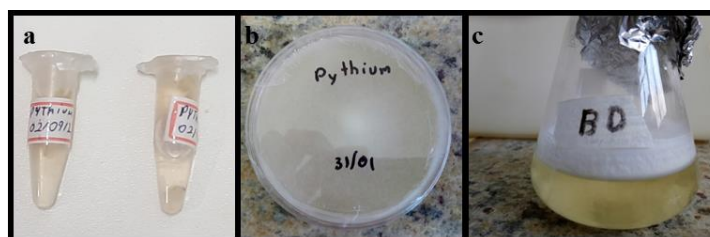


Figura 1: Isolado *Pythium aphanidermatum* a) Armazenado b) Meio de cultura sólido (BDA) c) Meio de cultura líquido (BD).

2.2 Preparação do agente autocicatrizante

Para preparação do agente autocicatrizante, foi adaptado do processo de produção de Inóculo fúngico [24]. A massa micelial foi coletada e lavada 3 vezes com água destilada

esterilizada. Removeu-se o excesso de umidade por prensagem manual em papel filtro. Posteriormente, 25g do micélio foi triturado na presença de 100ml de água, meio de cultura já preparado conforme Mesquita Jr (2022) [18], 6g de BD e 15g de CaCl₂.

2.3 Cimento CPV-ARI-RS

Para produção dos corpos de provas, foi utilizado cimento CPV-ARI-RS, da marca Itambé, a composição química se encontra na Tabela 1, os dados foram fornecidos pelo fabricante.

Tabela 1: Composição química do cimento CPV-ARI-RS

Químicos									
Al ₂ O ₃	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	SO ₃	Perda Fogo	CaO Livre	Resíd. Insol.	Equiv. Alcal.
6.45%	22.38%	3.41%	54.75%	4.66%	2.68%	3.22%	1.31%	10.50%	0.78%

2.4 Fibras pp(polipropileno)

Para controlar a fissuração dos corpos de provas, foram utilizados dois tipos de fibras de pp(polipropileno): Fibra1 (microfibras, NeoFibra MF) e Fibra2 (macrofibras, Duristeel FF54) (Figura 2). Suas propriedades físicas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físicas das fibras de polipropileno (pp).

Tipo de fibra	Característica da fibra	Densidade relativa (g/cm ³)	Diâmetro (µm)	Comprimento (mm)	Módulo de elasticidade (Gpa)	Resistência à tração (Mpa)	Deformação na ruptura (%)	Compatibilidade com a pasta de cimento
Fibra 1	Microfibrilas de polipropileno	0.91	12 - 21	6 - 24	4	400	450	Boa
Fibra 2	Polipropileno	0.97	480	54	5	250	300	Excelente

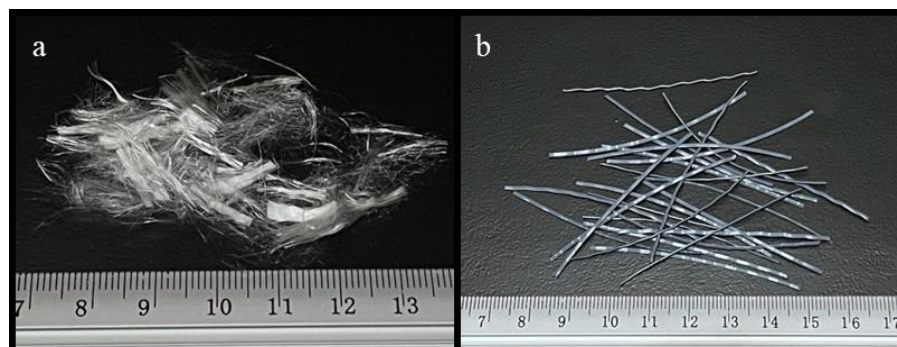


Figura 2: Fibras de polipropileno (pp): a-Fibra1; b-Fibra2

2.5 Produção dos corpos de prova

Os corpos de prova (cps) foram produzidos com dimensões 40mm × 40 mm × 160mm (Figura 3) [6]. Foi produzido pasta de cimento e foi adicionado 0.5% fibra 1 e 0.5% fibra 2, adaptado de [25].

A relação água cimento (a/c) foi de 0.3. Foi utilizado 1% sobre o peso do cimento (spc) de superplastificante Linha CQ Plast MR, adaptado [10]. Cps com dimensões 10mm × 10mm × 60mm, em forma de silicone, foram produzidos com adição de fibras pp.



Figura 3: Corpos de prova de pasta de cimento 60mm x 40mm x 40mm.

2.6 Delineamento experimental

Foram produzidos 12 cps com dimensões 10mm × 10mm × 60mm, que foram fissurados aos 14 dias. Foram avaliados a progressão das fissuras em 3 cps depois 3, 7, 28 e 56 dias após a produção das fissuras.

Foram produzidas 75 unidades de cps com dimensões de 40mm × 40mm × 160mm. Destes, 60 foram fissurados aos 14 dias após sua produção. 9 corpos de prova foram ensaiados durante o ensaio de recuperação de carga que foram realizados 7, 28 e 56 dias após a fissuração nos demais. Na Tabela 3, segue o delineamento experimental dos tratamentos.

Tabela 3: Delineamento experimental.

Tratamento	Descrição
R	Intactos, não tiveram indução de fissura
T1	Inoculado meio de cultura com o <i>Pythium</i>
T2	Meio de cultura
T3	Adicionado água
T4	Fissurado, mas sem adição de agentes

2.7 Indução de fissura

Nos cps com dimensões 10mm × 10mm × 60mm, foi utilizada uma lâmina de aço serrilhada com espessura de 0.3 mm, a fim de obter uma fissura de profundidade de aproximadamente 2 mm.

Para fissuração dos cps com dimensões de 40mm × 40mm × 160mm foi realizado ensaio de flexão de 3 pontos após 14 dias da produção, de acordo com as normas BS EN 12390-5 (2009) e ASTM: D790-10 (2010). Os prismas foram carregados ao longo de um vão de 100mm e a uma velocidade de 0.125 mm/min [6].

O ensaio foi interrompido quando a abertura da fissura obteve aproximadamente 1 mm. A Figura 4 mostra a realização do ensaio.

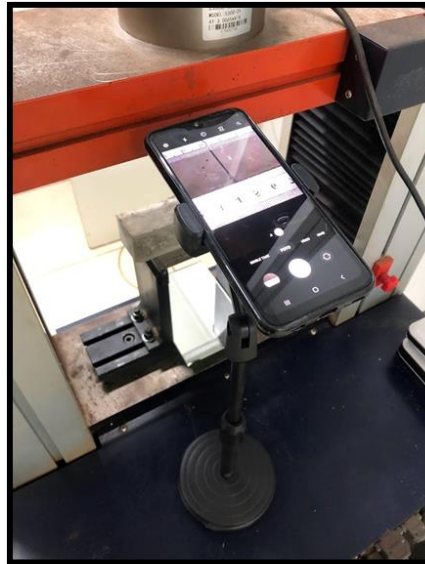


Figura 4: Sistema para controle da introdução a fissura.

Calcula-se a tensão máxima de ruptura $F(\max, rec)$ através da equação (1), [4]

$$\sigma(\max, rec) = \frac{3.P.D}{2.B.H^2} \quad (1)$$

Onde: P = Valor médio da carga máxima de pelo menos três valores medidos, em N; D = Vão do ensaio em mm; B = Espessura do corpo de ensaio em mm; H = Altura do corpo de ensaio em mm; σ = Resistência à flexão, em Mpa.

2.8 Aplicação do agente autocatrizante

Após a indução das fissuras nos cps com dimensões 40mm × 40mm x 160mm, nos tratamentos T1 e T2, foram aspergidos 40ml de meio de cultura por toda superfície. No

tratamento T3 40 ml de água. Logo após, em T1, foi aplicado 4 ml do agente autocicatrizante na região da fissura, em T2 4ml de meio de cultura e em T3 4 ml de água conforme. Todos os tratamentos foram colocados em estufa a 25°C e 90% de umidade.

Nos cps com dimensões 10mm × 10mm × 60mm, foram aspergidos 5ml de meio de cultura por toda superfície, em seguida, foi aplicado 1 ml do agente autocicatrizante na região da fissura conforme. Todos os cps foram colocados em estufa a 25°C e 90% de umidade.

2.9 Recuperação de área

Foram feitas imagens logo após a fissuração, ao qual se mediu a largura da fissura e sua área, avaliados os mesmos cps em 7, 28 e 56 dias. Foi utilizado o microscópio estereoscópio com epi-fluorescência SMZ 1500 (Nikon) para a captura de imagem, medição da fissura e cálculo da área.

A eficiência da vedação foi obtida pela relação da área da fissura em relação á área vedada, em 7, 28 e 56 dias, conforme equação (2) [8].

$$A = \frac{A(0)-A(T)}{A(0)} \quad (2)$$

Onde: A = Eficiência de vedação em %; A(0) = Área da seção transversal da fissura imediatamente após a fissuração; A(t) = Área da seção transversal.

2.10 Análise de evolução da vedação.

Para avaliação da progressão da vedação por imagem foi realizado em 3 cps com dimensões 10mm × 10mm × 60mm aos 3, 7, 28 e 56 dias após a fissuração. Os cps foram colocados em estufa a 50°C por 24 horas. Foi utilizado o microscópio estereoscópio com epi-fluorescência SMZ 1500 (Nikon), as medidas feitas no software do microscópio.

2.11 Absorção de água.

A absorção de água nos tratamentos R, T1, T2, T3 e T4, foi medida de acordo com o método ASTM-C1585 [20] adaptado, em 7, 28 e 56 dias. Foram secados em estufa a 50 °C por 3 dias. Em seguida, colocados em contato com a água a uma profundidade entre 1 e 3 mm. As massas das amostras de argamassa foram registradas após determinados períodos de tempo (5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 6h , 1 dia, 2 dias, 3 dias). A taxa de absorção é obtida pela equação (3), [4]

$$I = \frac{\Delta M}{AX\rho} \quad (3)$$

Onde:

I = Taxa de absorção em mm; ΔM = Diferença da massa seca e massa úmida, em g; A = área da seção do corpo de prova em mm²; ρ = Densidade da água em g/mm³.

O gráfico do resultado foi plotado no eixo da raiz quadrado de tempo (min^{1/2}) [28].

2.12 Recuperação de carga.

Após 7, 28 e 56 dias de indução da fissura, foram ensaiados novamente os cps anteriormente fissurados, com o intuito de calcular a recuperação de carga do mesmo. [4][7][8].

Utilizou-se o cálculo da tensão máxima de ruptura σ (max,rec) através da equação (1) para o cálculo da porcentagem de recuperação de força RC(%) pela equação (4) [4].

$$RC(\%) = \frac{\sigma(REC)}{\sigma(MAX)} \quad (4)$$

Onde: R(%)= Recuperação da força em %; σ (rec) = Tensão máxima de ruptura do corpo de prova fissurado.; σ (max) = Tensão máxima de ruptura do corpo de prova intacto.

2.13 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por dispersão de elétrons (EDS).

Foram retiradas amostras do interior das fissuras após os ensaios de recuperação de carga para a obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microanálise qualitativa (espectro) e semi-quantitativa de elementos químicos presentes na amostra (EDS) no MEV-FEG de Ultra-alta Resolução com uma voltagem de 20keV localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.14 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Scott-Knott a 5% de significância e avaliados, estatisticamente, com o uso do software Sisvar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A largura das fissuras foi medida logo após sua indução. Aos 14 dias, após sua produção, os cps com dimensões de 10mm × 10mm × 60mm a fissura foi produzida com lâmina de aço serrilhada com espessura de 0.3mm. A abertura da fissura obteve valor médio de 544.21µm, com desvia padrão de 0.28 (Figura 5-a).

Os cps com dimensões 40mm × 40mm × 160mm foram pré-fissurados por ensaio de flexão de 3 pontos. A abertura da fissura obteve o valor médio de 576.28µm, com desvio padrão de 0.41µm (Figura 5-b). O ensaio de pré-fissuração foi interrompido apenas quando a fissura obtivesse 1mm de largura. Entretanto, os resultados foram em média 58% do valor de abertura de fissura alcançado no ensaio. Isso ocorre devido as fibras de pp ser um material dúctil e parte das fibras ainda estarem na fase elástica, o que levou ao retorno da abertura da fissura [29][30]. Essas medias podem prejudicar a análise da eficiência da vedação, pois as fissuras com espessura maiores que 400µm são difíceis de serem vedadas por processo de autociclicarização [39][40][41][42].

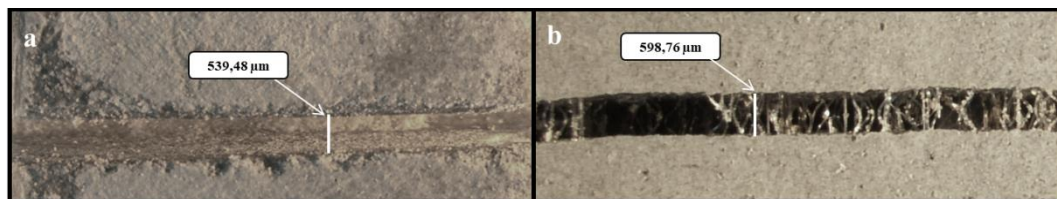


Figura 5: a- Medição da abertura da fissura do cp com dimensões 10mm × 10mm × 60 mm; b- Medição da abertura da fissura do cp com dimensões 40mm × 40mm × 160mm.

A área das fissuras foi medida logo após a pré-fissuração, antes da inoculação do *Pythium* e depois de 7, 28 e 56 dias para o cálculo da recuperação de área, como mostra (Figura 6-a e b).

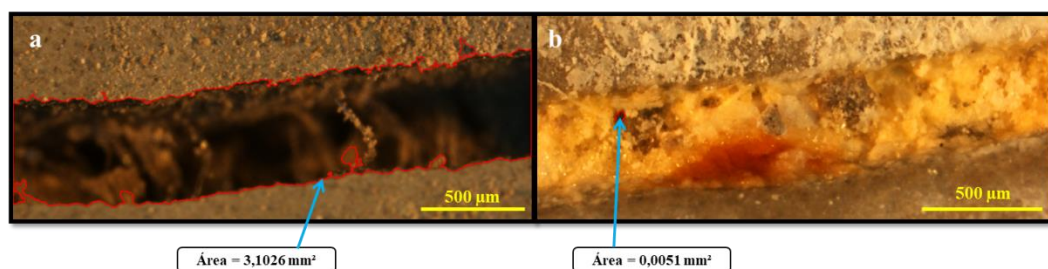


Figura 6: a- Medição da área para calcular a recuperação de área (RA); a- Medição da área logo após a pré-fissuração; Medição da área aos 7, 28 e 56 dias após a pré-fissuração.

Apenas no tratamento T1 que foi inoculado o *Pythium* ocorreu a diminuição da área da fissura devido ao processo de vedação. A RA aumentou progressivamente em relação ao tempo de 7, 28 e 56 dias. Os valores de RA obtiveram diferenças estatisticamente significativas entre os dias (Figura 7).

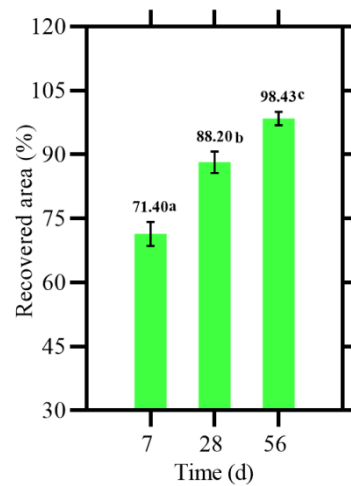


Figura 7: Gráfico com os valores da recuperação de área (RA) em porcentagem. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de significância.

O ensaio de 7 dias obteve o menor resultado de RA que foi 71.40%, é visto uma vedação acentuada na área da fissura, porém ainda se encontra grandes espaços sem preenchimento (Figura 8-a e b).

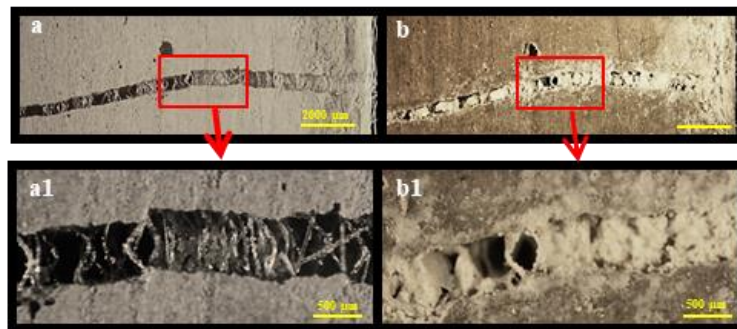


Figura 8: Imagem das fissuras: a- após pré-fissuração; b- 7 dias.

Em 28 dias após a pré-fissuração pode ser observado a RA com 88.20%. Houve um significativo aumento em relação a 7 dias. Pode ser observado pequenos espaços sem preenchimento na fissura e ausência de grande vazios (Figura 9-a e b).

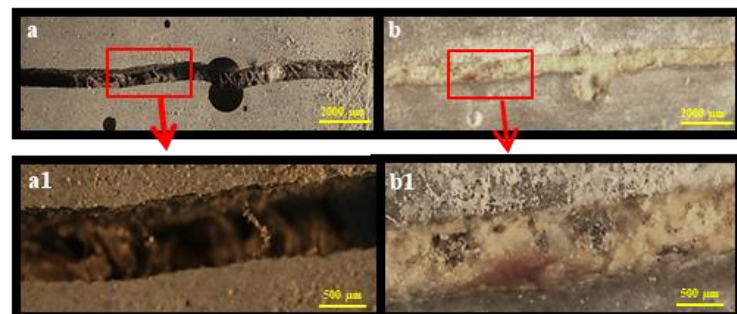


Figura 9: Imagem das fissuras: a- após pré-fissuração; b- 14 dias

O melhor resultado de RA foi encontrado aos 56 dias com 98.43%. A região da fissura encontra-se completamente vedada. Encontra-se espaços vazios na fissura Figura 10 - a e b. Com esse

resultado, pode-se afirmar que aos 56 dias, a vedação da fissura foi completa, pois, a medição da eficiência da vedação pela recuperação de área considerado um meio eficaz [4].

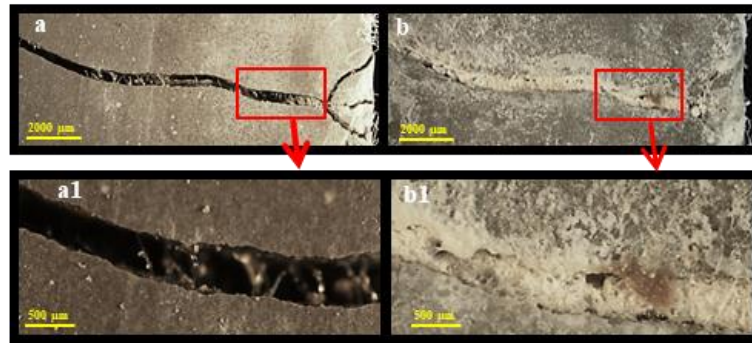


Figura 10: Imagem das fissuras: a- após pré-fissuração; b- 14 dias

A evolução da vedação nos cps nos com dimensões de $10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 60\text{mm}$, começou a ser observado aos 3 dias. Nesse período pode-se observar o início do desenvolvimento do *Pythium*, assim como a presença de alguns cristais (Figura 11-a1, a2 e a3).

Aos 7 dias o processo de vedação se encontra em progresso, a diminuição da abertura da fissura é visível e a parte interna da fissura começa a ser tomada por cristais. É possível observar hifas por toda a fissura, assim como o aumento da cristalização (Figura 11-b1, b2, b3 e b4).

Aos 28 dias a fissura se encontra quase totalmente vedada, ainda existem áreas fissuradas e é possível observar hifas isoladas em alguns pontos. Todo o restante se tornou uniforme (Figura 11-c1, c2 e c3).

Aos 56 dias a linha da fissura está totalmente vedada e não é possível observar mais a abertura de fissura. Não é possível diferenciar os componentes da vedação, apenas uma massa única e coesa e uniforme (Figura 11-d1, c2 e c3).

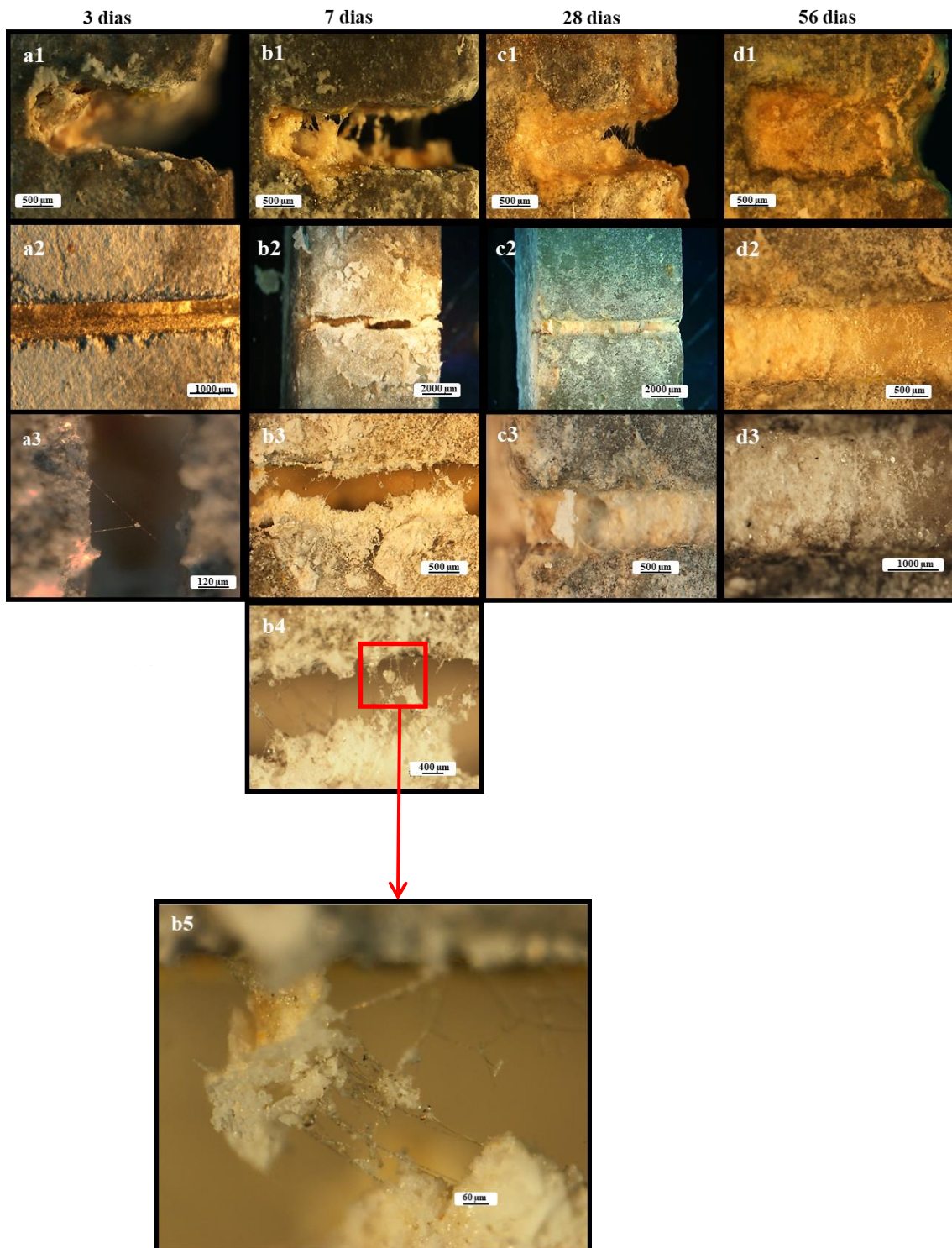


Figura 11: Imagem da evolução da vedação das fissuras em cps com dimensões de 10mm × 10mm × 60mm: a-3 dias; b- 7 dias; c-28 dias; d-56 dias.

Devido aos efeitos capilares, a água é absorvida na superfície dos corpos de prova. A quantidade de água absorvida por unidade de área é proporcional à raiz quadrada do tempo [31]. A capacidade de absorção de um material é inversamente proporcional ao raio de seus poros de acordo com a equação de Kelvin-Laplace [32]. À medida que as fissuras cicatrizam,

o caminho de penetração da água pode ser bloqueado. Neste aspecto, a absorção de água pode ser usada para avaliar a eficiência de autocicatrização de um material [33].

As Figuras 12-a, b, c e d mostram as curvas de AA realizados na pré-fissuração, antes da aplicação do agente autocicatrizante e 7, 28 e 56 dias subsequentes. Na Figura 12-a, observou-se que todos os cps que foram fissurados tiveram um comportamento similar e obtiveram, em média, um aumento de AA absorção de água de 62% em relação a referência. Isso ocorreu devido aos vazios deixados pelas fissuras que fornecem mais caminhos potenciais para a penetração de água em momentos iniciais [34]. Já na Figura 12-b, ocorreu uma diminuição da AA, em todos os tratamentos, com resultados mais significativos em T1 e T2, o maior valor foi T1, que reduziu 14.5% e T1 registrou a maior redução. Evidenciou-se significativa eficiência da vedação. Os resultados foram similares ao encontrados por Jiang et al. [35]. Nos gráficos de 28 e 56 dias, continuaram a registrar a diminuição da AA, embora sem diferenças significativas.

As fissuras foram gradualmente preenchidas e até fechadas pelos produtos como resultado da reação química dos minerais com os produtos hidratados assim que a água absorvida penetrou nas fissuras. Em T1 esse fenômeno foi potencializado pelo agente autocicatrizante.

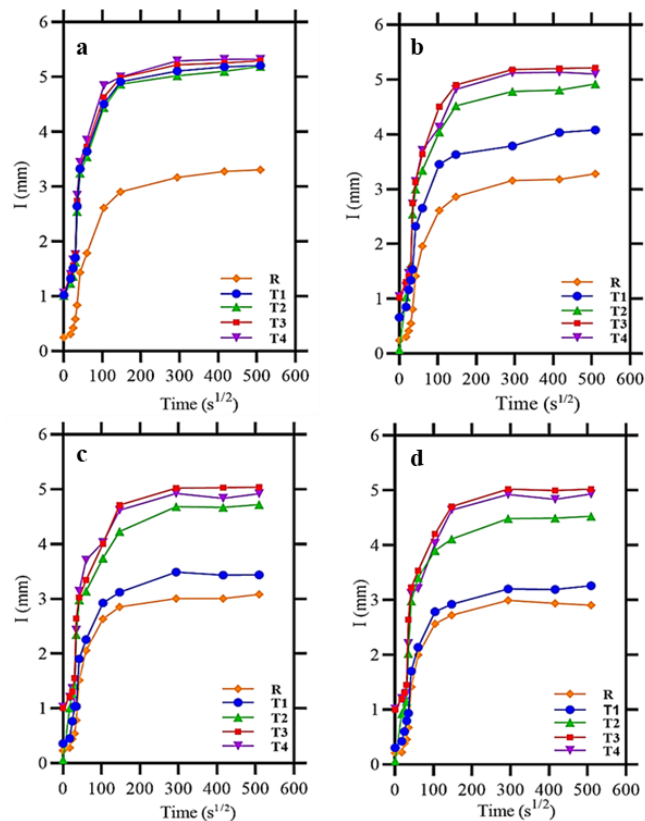


Figura 12: Resultado de absorção de água para os tratamentos: a-14 dias, indução da fissura; b- Após 7 dias da fissuração; c- Após 28 dias da fissuração; d- Após 56 dias da fissuração.

A inclinação (coeficiente angular) do segmento linear corresponde ao Módulo de Elasticidade, que pode ser considerado uma medida de rigidez [25][36]. Na Figura 13-a mostra as curvas características de tensão x deformação de R, que foram ensaiados aos 14, 21, 42, e 70 dias. Ao qual constata-se o aumento da rigidez com o decorrer do tempo A inclinação da curva aos 70 dias, apresenta maior inclinação, e a curva de 14 dias a menor inclinação. O incremento da rigidez com a idade da argamassa está de acordo com o relatado da literatura [34]. A diminuição da capacidade de deformação pode ser atribuída ao aumento contínuo da resistência de união interfacial e da tenacidade da matriz [38].

As Figuras 13-b, c e d correspondem ao gráfico de tensão x deformação dos ensaios de flexão para o cálculo da recuperação de carga (RC). Nota-se que o comportamento das curvas é similar em todos as datas que foram feitos os ensaios, onde se verifica um aumento da rigidez no tratamento T1 em relação aos demais. Esse resultado foi mais nítido em 7 e 56 dias, (Figura 13-b e d). Aos 28 dias esse aumento de rigidez é mais sutil. Esse aumento da rigidez é explicado por efeito reverso em abordagens baseadas em mecânica de dano contínuo que capturam o efeito da iniciação e propagação de trincas, reduzindo progressivamente a rigidez do material [39][40].

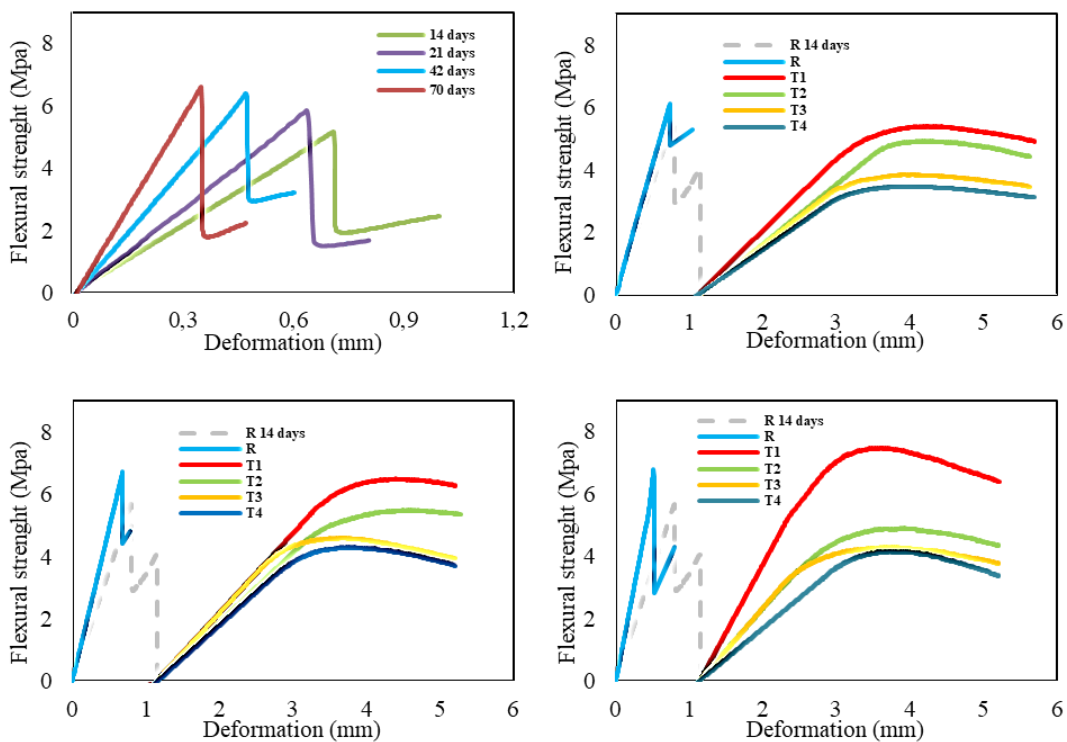


Figura 13: Curvas características de tensão x deformação: a- Referência; b- Após 7 dias da fissuração; c- Após 28 dias da fissuração; d- Após 56 dias da fissuração.

Ensaio de flexão de 3 pontos são o mais utilizado para o cálculo da RC em aut cicatrização devido a confiabilidade dos resultados [41].

O resultado dos testes de recuperação de carga confirma os ensaios de AA e RA, que apontam o tratamento T1 como eficiente na vedação das fissuras, pois aos 7 dias possui um RC de 76.2 %, o controle obteve 46%, o que mostra uma diferença de 30% de recuperação de carga. O tratamento T2 obteve resultados significativos, pois continha CaCl_2 , que levou a atingir RC de 57.8%, porém ainda inferior ao T1 em quase 20%.

Aos 56 dias o maior resultado, 103.6%, foi estatisticamente igual há 28 dias. Mostrando que em relação a recuperação de carga atinge a eficiência completa aos 28 dias. Entretanto, não reflete os resultados encontrados nos teste de AA e RA (Figura 14). Esses resultados demonstram que a maior eficiência de vedação da fissura é atingida aos 56 dias.

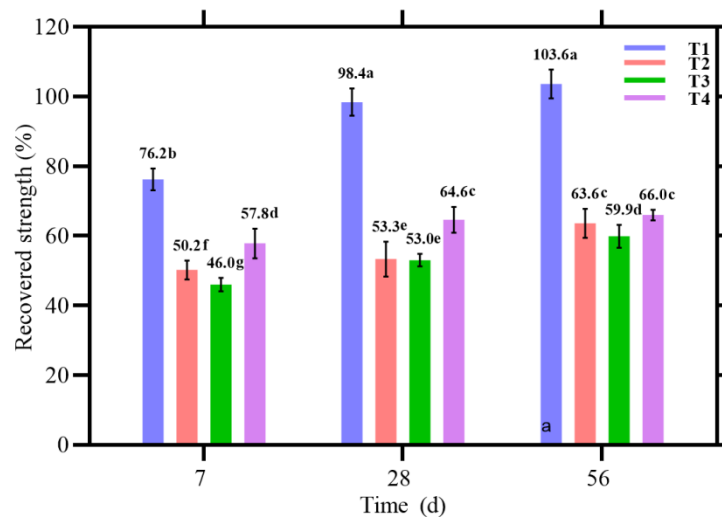


Figura 14: Gráfico com os resultados do ensaio de recuperação de carga (RC). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Em 3 cps, o ensaio de RC produziu novas fissuras. Foram 3 cps ao todo, 1 aos 28 dias e 2 aos 56 dias. O ensaio foi executado nas mesmas condições e nos mesmos pontos. Essa evidência colabora para o ensaio de RC, pois demonstra que o material que surgiu no local da fissura possui uma resistência mecânica maior que a do material pré-existente (Figura 15) [42][43].



Figura 15: Imagem de 1 cp que teve propagação o de fissuras em ponto adverso a fissura inicial.

Os resultados do EDS indicaram uma maior presença de cálcio (Ca), silício (Si), alumínio (Al) e ferro (Fe) em concentração maiores em 56 dias, uma pequena redução aos 28 dias e uma significativa redução os 7 dias e ausência de Fe (Figura 15). Esses achados podem colaborar para explicar os resultados de RC, RA e AA [35].

Os resultados de AA e RA estão diretamente relacionadas ao preenchimento da fissura. Com isso pode-se aferir que aos 7 dias as fissuras possuem uma selagem menos de 10% menor que aos 28 e 56 dias. Entretanto em relação à RC essa diferença é mais de 20%. Com o que foi mostrado no EDS, mostra que a selagem da fissura aos 7 dias é proveniente de uma maior quantidade de Carbonato de cálcio, enquanto na selagem aos 28 e 56 dias podemos encontrar uma maior concentração de cristais de aluminatos e possivelmente C-S-H. Esses, em principal o C-S-H, são responsáveis por aferir a matriz cimentícia uma maior resistência mecânica, [42][29][33].

Nas Figuras 16 - a, b, e c são imagens da região dos cps do tratamento T1 e é também possível observar a formação de cristais. As imagens de EDS do material na região central indicam uma maior quantidade de Ca aos 28(40.51%) dias, com menor quantidade aos 7 dias (25.31%). Maior quantidade de Si (6.66%), Al (2.76%) e Fe(1.35%) em 56 dias. Evidencia que aos 27 dias há maior presença de carbonato de cálcio, C-S-H e aluminatos aos 56 dias.

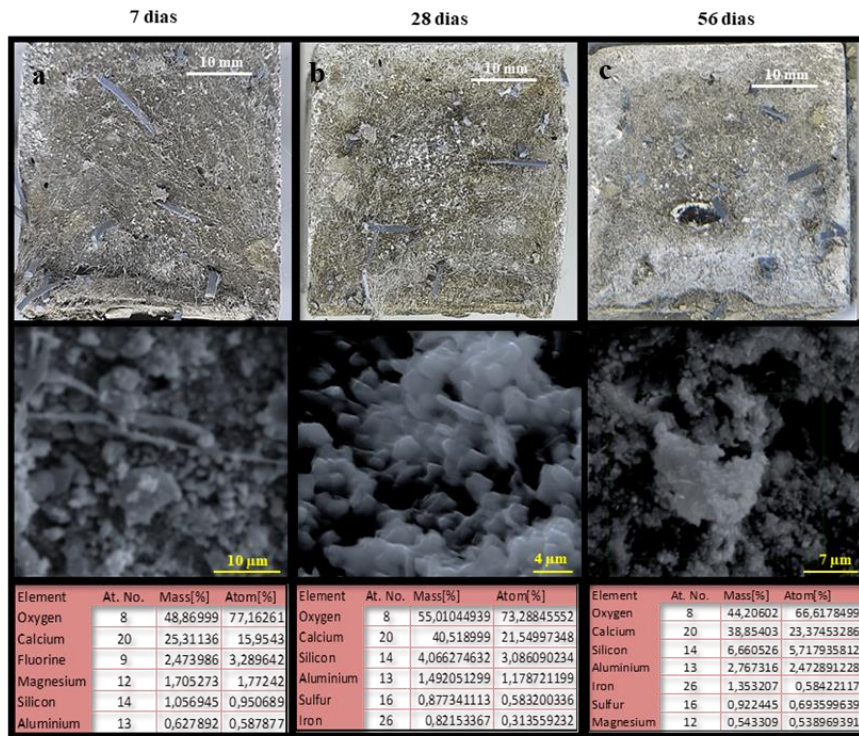


Figura 16: Imagens de EDS a-7 dias; b-28-dias; c-56 dias.

As Figuras 17, 18 e 19 são imagens de EDS em hifas de *Pythium* que foram obtidas das fissuras em 7, 28 e 56 dias. Essas imagens mostram que na superfície das hifas aumentam a quantidade de Ca, Si, Al e Fe no decorrer do tempo e evidenciam formação de cristais na interface das hifas, que aumenta sua interação com a matriz, o que corrobora com os resultados anteriores que demonstram a vedação das fissuras.

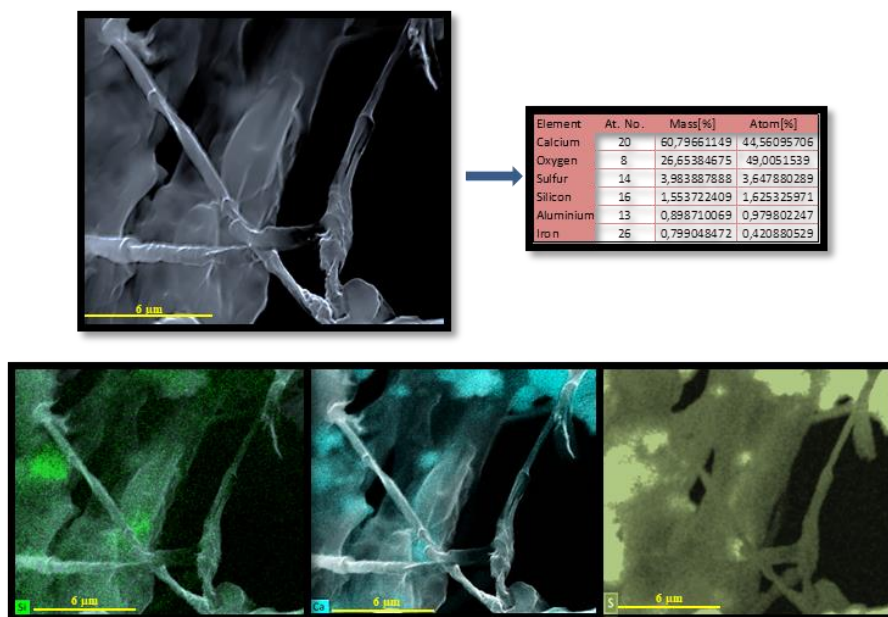


Figura 17: Imagem EDS aos 7 dias

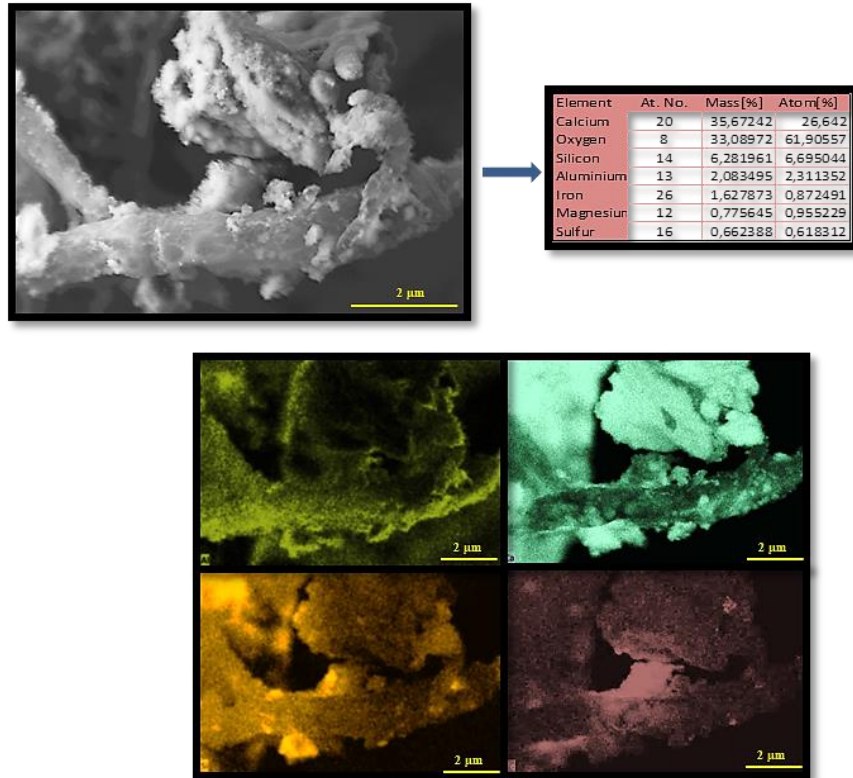


Figura 18: Imagem EDS aos 28 dias.

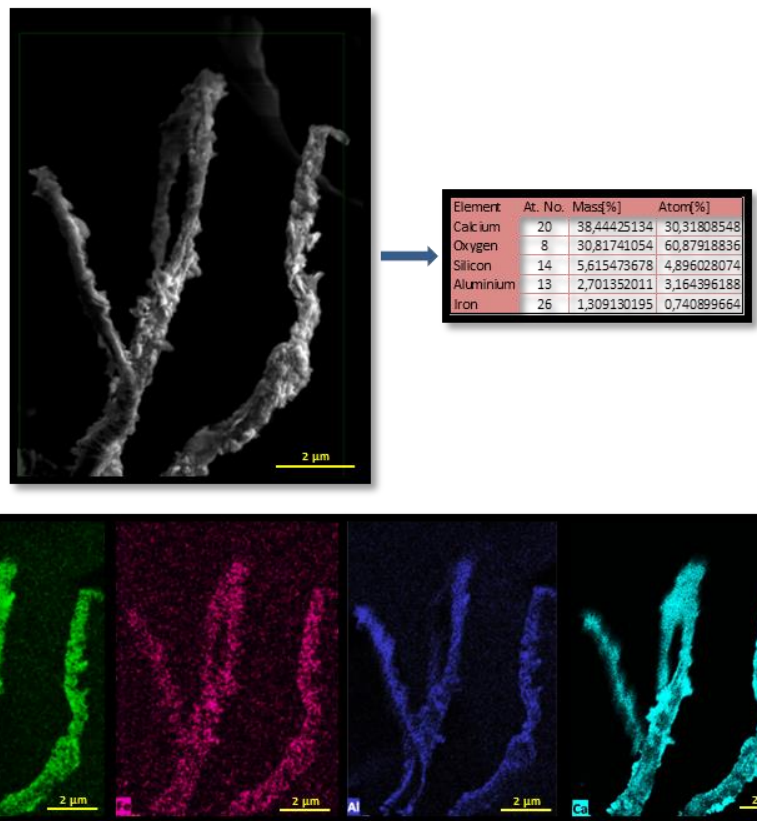


Figura 19: Imagem EDS aos 28 dias.

A Figura 20 (Imagem do MEV) mostra interação das hifas com a matriz cimentícia. Pode ser visto por toda estrutura a formação de produtos de hidratação aderidas a hifa. Essas evidências em conjunto com os dados de resistência mecânica indicam que o *Pythium* aderiu a matriz de forma coesa e funcionou como reforço estrutural na linha de fissura.

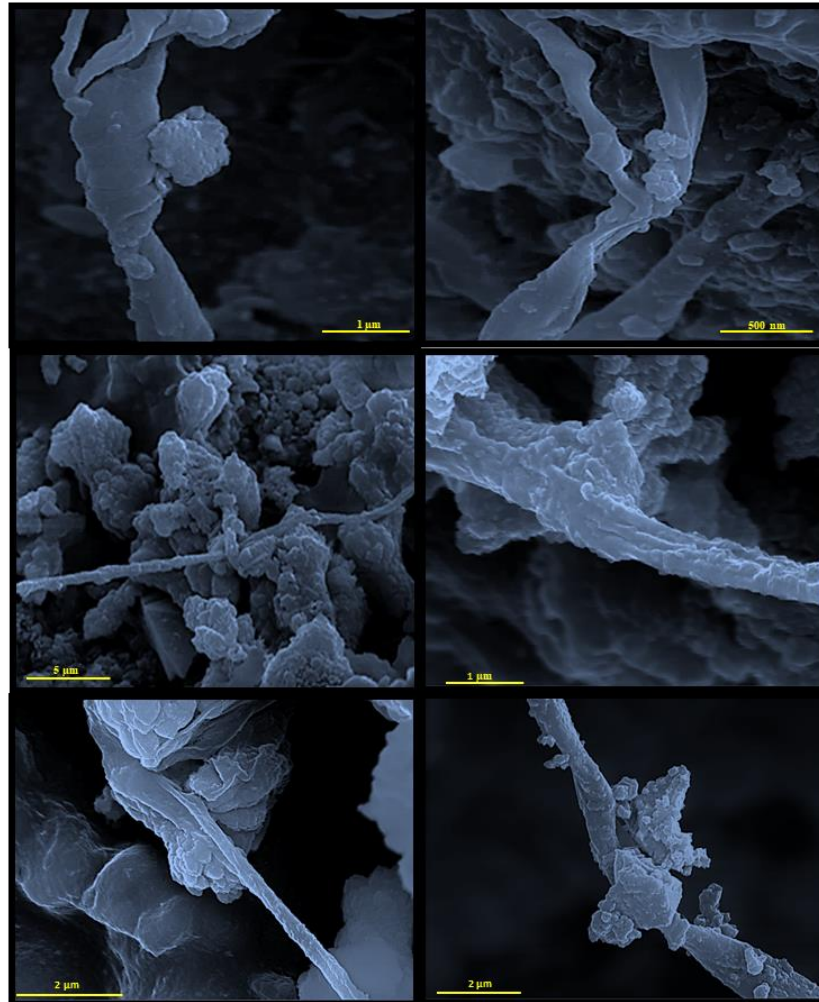


Figura 20: Imagem de MEV das hifas na região fissurada.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

1. Houve vedação das fissuras, pois a recuperação da área obteve resposta significativa em 7 dias, chegando a 98,43% de vedação aos 56 dias.
2. O processo de cicatrização começou a ser percebido em 3 dias
3. A vedação da fissura foi eficiente para diminuir a absorção de água.
4. A recuperação de carga chegou a resultado próximo de 100% em 28 dias. Os resultados de 56 dias mostram que houve um aumento de resistência mecânica na região da fissura.

5. Resultados do EDS e MEV mostram que aos 7 dias predominou a formação de CaCO_3 na linha de fissura e aos 28 e 56 dias uma maior presença de aluminatos e C-S-H, justificando o aumento de resistência mecânica na região fissurada.
6. Com os resultados obtidos, temos no *Pythium aphanidermatum* um microrganismo com possibilidade de ser utilizado como agente autocicatrizante em matrizes cimentícias.
7. São necessários mais estudos em relação a aplicação e a durabilidade do agente. Assim como estudos práticos de sua utilização.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Agência Federal de Apoio e Avaliação da Educação de Pós-Graduação (CAPES), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos estudantes, técnicos e professores dos Laboratórios de Biologia Molecular, Materiais de Construção Civil e UEPAM da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela disponibilidade e auxílio na realização de análises.

6. REFERÊNCIAS

- [1] J. FEITEIRA, E. GRUYAERT, N. DE BELIE, Self-healing of moving cracks in concrete by means of encapsulated polymer precursors, *Construction and Building Materials*, v. 102, p. 671-678, 2016.
- [2] LI, V. C.; WU, C.; WANG, S.; OGAWA, A.; SAITO, T., Interface tailoring for strain-hardening polyvinyl alcohol - engineered cementitious composites (PVA-ECC) *ACI Mater. J.*, 99 (5), pp. 463-472, 2019.
- [3] CAIHONG XUE, Performance and mechanisms of stimulated self-healing in cement-based composites exposed to saline environments, *Cement and Concrete Composites*, Volume 129, 104470, 2022.
- [4] QURESHI, T.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Autogenous self-healing of cement with expansive minerals-I: Impact in early age crack healing. *Construction and Building Materials*, v. 192, p. 768-784, 2019.
- [5] DU, W.; YU, J.; GU, Y.; LI, Y.; HAN, X.; LIU, Q. Preparation and application of microcapsules containing toluene-di-isocyanate for self-healing of concrete. *Construction and Building Materials*, v. 202, p. 762-769, 2019

- [6] WANG, X.; FANG, C.; LI D.; HAN, N.; XING, F. A self-healing cementitious composite with mineral admixtures and built-in carbonate. *Cement and Concrete Composites* v. 92, p. 216–229, 2018.
- [7] OLIVEIRA, A.S.; GOMES, O.F.M.; FERRARA, L.; FAIRBAIRN, E.M.R.; TOLEDO FILHO, R.D. An overview of a twofold effect of crystalline admixtures in cement-based materials: from permeability-reducers to self-healing stimulators, *Journal of Building Engineering*, v.41, 2021.
- [8] DONG, B. et al. Self-healing features in cementitious material with urea–formaldehyde/epoxy microcapsules. *Construction and Building Materials*, v. 106, p. 608–617, mar. 2016.
- [9] ROOIJ M., VAN TITTELBOOM K., BELIE N., SCHLANGEN E., *Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials: State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee*, Springer, 2013.
- [10] HUSEIENA, G. F.; SHAHB, K. W.; SAMA, A. R. M., Sustainability of nanomaterials based self-healing concrete: An all-inclusive Insight. *Journal of Building Engineering*, v.23, p. 155–171, 2019.
- [11] GONÇALVES, J.; EL-BAKKARI, M.; BOLUK, Y.; BINDIGANAVILE, V. Cellulose nanofibres (CNF) for sulphate resistance in cement based systems. *Cement and Concrete Composites*, v. 99, p.100–111, 2019.
- [12] M. NASIM, United Kingdom Secretary, SV DeoAutonomous healing in concrete by crystalline mixture: a review *Friend. Today Proc.*, v. 32, p. 638-644, 2020.
- [13] HA ALGAIFI, SA BAKAR, R. ALYOUSEF, ARM SAM, MW IBRAHIM, S. SHAHIDAN, M. IBRAHIM, BA SALAMI Autocicatrização bioinspirada de fissuras de concreto usando novas espécies de *B. pseudomycooides*. *J. Mater. Res. Tecnol*, v.12, p.967-981, 2021.
- [14] WENXIANG DU, CHUNXIANG QIAN, YUDONG XIE, Demonstration application of microbial self-healing concrete in sidewall of underground engineering: A case study, *Journal of Building Engineering*, Volume 63, Part A, 105512, 2023.
- [15] FERRARA, L.; KRELANI, V.; GEMINIANI M.; GORLEZZA R., Self healing of high performance fibre reinforced cementitious composites. In: *Improving performance of concrete structures. Proc. 4th Intl. fib Congress 2014 Mumbai, India*, v.8, p. 883–887, 2014.
- [16] MOREIRA, T.; VISAR, K.; FERREIRA, S.; FERRARA, L.; SILVA, F.; ROMILDO, T., F. Self Healing Assessment under tensile loads of ultra high performance fiber reinforced concrete (UHPFRC), 9th RILEM International Symposium on Fiber Reinforced Concrete - BEFIB 19-21 September 2016.
- [17] SALAHLIDIN, O. D.; VDHAFAER ALRAWI, D.; BUNIYA, K. H., Partial purification of pepsin enzyme produced by *Staphylococcus sciuri* and *Pythium* sp. using whey, *MaterialToday Proceedings*, Available online 11 May 2021.

- [18] MESQUITA JR. L., Desenvolvimento de agente biológico para autocicatrização em matrizes cimentícias. Tese (Doutorado em Engenharia de Biomateriais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2022.
- [19] LI, N.; ZHOU, Q.; CHANG, K.; YU, H.; HWANG, S.; CONNER, R. L., STRELKOV, S.L.; DEBRA L. MCLAREN, D. L.; TURNBULL, G. D., Occurrence, pathogenicity and species identification of *Pythium* causing root rot of soybean in Alberta and Manitoba, Canada Crop Protection, v.118, p.36-43, 2018.
- [20] KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W. & STALPERS, J.A., Dictionary of Fungi. 10th ed. Wallingford, UK: CAB International Publishing, p.396, 2008.
- [21] C.C. APARECIDO, C. CAMILO*, R.S. VAZ LOBO, ação de Divulgação técnica, Preservação de *Pythium* e *Phytophthora* a -80° C. *Biológico*, São Paulo, v.75, n.1, p.5-10, jan./jun., 2013.
- [22] A. JEEVALATHA, FATHIMATH ZUMAILA, C.N. BIJU, K.C. PUNYA, Duplex recombinase polymerase amplification assay for simultaneous detection of *Pythium* spp. And *Ralstonia pseudosolanacearum* from ginger rhizomes, *Crop Protection*, Volume 161, 106057,2022.
- [23] SIQIAO CHEN, PAUL DALY, DONGMEI ZHOU, JINGJING LI, XIAOYU WANG, SHENG DENG, HUI FENG, CHUNTING WANG, TAHA MAJID MAHMOOD SHEIKH, YIFAN CHEN, TAIQIANG XUE, FENG CAI, CHRISTIAN P. KUBICEK, LIHUI WEI, IRINA S. DRUZHININA. The use of mutant and engineered microbial agents for biological control of plant diseases caused by *Pythium*: Achievements versus challenges, *Fungal Biology Reviews*, v. 40, p. 76-90, 2022.
- [24] SANTOS, DE S., G., Fungos apodrecedores de madeira produzem voláteis tóxicos a patógenos de eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)—Universidade Federal de Lavras, 2015.
- [25] SHEN L., YAO X., LUZIO G., DI, JIANG M., HAN Y. Mix optimization of hybrid steel and polypropylene fiber-reinforced concrete for anti-thermal spalling, *Journal of Building Engineering*, Volume 63, Part A, 105409, 2023.
- [26] EN 12390-5: Testing Hardened Concrete. Flexural Strength of Test Specimens, BSI British Standards; 2009.
- [27] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D790-10: Standard Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials, ASTM International, West Conshohocken, PA; 2010.
- [28] JIANG Z., LI W., YUAN Z., Influence of mineral additives and environmental conditions on the self-healing capabilities of cementitious materials, *Cement and Concrete Composites*, v.57, p. 116-127, 2015.
- [29] YANG, Y., LEPECH, M. D., YANG, E.-H., AND LI, V. C. Autogenous healing of engineered cementitious composites under wet dry cycles. *Cement and Concrete Research*, 39(5): p.382-390, 2009.

- [30] BALGOURINEJAD N., HAGHIGHIFAR M., MADANDOUST R., CHARKHTAB S., Experimental study on mechanical properties, microstructural of lightweight concrete incorporating polypropylene fibers and metakaolin at high temperatures, *Journal of Materials Research and Technology*, v.18, p. 5238-5256, 2022.
- [31] D.A. QUENARD, K. XU, H.M. KÜNZEL, Microstructure and transport properties of porous building materials *Mater Struct*, 31 (5), pp. 317-324, 1998.
- [32] C. HALL, Barrier performance of concrete: a review of fluid transport theory, *Mater Struct*, 27 (5) (1994), pp. 291-306
- [33] JIANG Z., LI W., YUAN Z., Influence of mineral additives and environmental conditions on the self-healing capabilities of cementitious materials, *Cement and Concrete Composites*, v.57, p. 116-127, 2015.
- [34] JIANYOU LU, ZILONG ZHOU, XINQING CHEN, PEIYU WANG, YICHAO RUI, XIN CAI, Experimental investigation on mode I fracture characteristics of rock-concrete interface at different ages, *Construction and Building Materials*, Volume 349., 128735, 2022.
- [35] LU JIANG, WEI LU, WENJING WANG, YU ZHANG, QIANGQIANG HAN, ZHU LI, Mechanical properties and frost resistance of self-healing concrete based on expended perlite immobilized bacteria, *Construction and Building Materials*, Volume 348 ,128652, 2022.
- [36] LING LI, YUDAN JIN, YUN JIA, THOMAS ROUGELOT, NICOLAS BURLION, JIANFU SHAO, Influence of inclusion rigidity on shrinkage induced micro-cracking of cementitious materials, *Cement and Concrete Composites*, Volume 114, 103773, 2020.
- [37] JOHANNES BERGER, Effects of flexural stiffness on constraints of imposed deformations in reinforced concrete structures, *Engineering Structures*, Volume 272, 114973, 2022.
- [38] LU JIANG, WEI LU, WENJING WANG, YU ZHANG, QIANGQIANG HAN, ZHU LI, Mechanical properties and frost resistance of self-healing concrete based on expended perlite immobilized bacteria, *Construction and Building Materials*, Volume 348,2022,128652.
- [39] MAYANK GUPTA, MEENAKSHI SHARMA, SHASHANK BISHNOI, Multiscale modelling of uniaxial compressive stress-strain behaviour of concrete using analytical homogenisation and damage mechanics,*Mechanics of Materials*,Volume 173,104430, 2022.
- [40] SHARMA M., BISHNOI S., Influence of properties of interfacial transition zone on elastic modulus of concrete: Evidence from micromechanical modelling, *Construction and Building Materials*, Volume 246, 118381, 2020.
- [41] QIANA, C.; ZHANGA, Y.; XI, Y., Effect of ion concentration in crack zone on healing degree of microbial self-healing concrete, *Construction and Building Materials*, v.286, p, 2021

[42] HUI MA, SHUNZHI QIAN, ZHIGANG ZHANG, Effect of self-healing on water permeability and mechanical property of Medium-Early-Strength Engineered Cementitious Composites, *Construction and Building Materials*, Volume 68, PAGES 92-101,2014.

[43] ZHANG, J. L.; R. S. WU, R. S.; LI, Y. M.; ZHONG, J. Y.; DENG, X.; LIU, B.; N. X. HAN, N. X.; XING, F., Screening of bacteria for self-healing of concrete cracks and optimization of the microbial calcium precipitation process, *Appl Microbiol Biotechnol*, v.100, p.6661–6670, 2016.

ANEXO – Documentos da patente

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA	
---	--	---

QUESTIONÁRIO DE INVENÇÃO**LEIA AS INSTRUÇÕES ANTES DO PREENCHIMENTO**

- Após o parecer favorável da patenteabilidade da invenção, os inventores terão prazo de 30 dias para enviar a redação da patente, sob pena de arquivamento do pedido e responsabilização dos inventores por eventuais prejuízos decorrentes da morosidade, conforme disposto nos artigos 121, 122, 124 e 125 da lei nº 8.112/90. Excepcionalmente este prazo poderá ser prorrogado por até 30 dias mediante pedido fundamentado a ser analisado pela equipe do NINTEC/UFLA.
- Todos os campos de resposta deste questionário deverão ser preenchidos.
- Em caso de dúvida, entrar em contato com a equipe do Nintec (nintec@nintec.ufla.br ou 3829-1591).

1 - DADOS GERAIS		
1.1 - Inventor / coordenador		
Nome completo: SAULO ROCHA FERREIRA		
CPF: 027.004.083-81	RG:	Estado civil: SOLTEIRO
Qualificação/titulação: DOUTORADO EM ENG. CIVIL		
Departamento / laboratório: DEG		
Cargo / Função: PROFESSOR		
Endereço Completo: Nieder-Ramstädter Str. 130, Darmstadt - Alemanha		CEP: 64287
Telefone (fixo e celular): +49 176 69507638	E-mail: FERREIRA.SR@HOTMAIL.COM	
1.2 - Outros inventores		
Nome completo: LAERCIO MESQUITA JÚNIOR		
CPF: 03509326628	RG: MG 7170832	Estado civil: SOLTEIRO
Qualificação/titulação: MESTRE EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS / DOUTORA EM FITOPATOLOGIA		
Departamento / laboratório: ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS		
Cargo / Função: ALUNO		
Endereço Completo: RUA PRADRE FREDERICO BANGDER-21-CENTENÁRIO		CEP: 37203612
Telefone (fixo e celular):	E-mail:	
Nome completo: DIEGO BORGES SILVA		
CPF: 127.553.956-48	RG: MG 19.060.989	Estado civil: SOLTEIRO
Qualificação/titulação: GRADUANDO EM ENGENHARIA CIVIL		
Departamento / laboratório: DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA		
Cargo / Função: ALUNO		
Endereço Completo: RUA LÊONCIO ALVES CABRAL-77-CENTENÁRIO		CEP: 37200000

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA	
---	--	---

Telefone (fixo e celular): (35)98877-4917		E-mail: DIEGOBORGESSILVA10@GMAIL.COM	
Nome completo: GIOVANNI FRANCISCO RABELO			
CPF: 53026144649	RG: M2749167	Estado civil: CASADO	
Qualificação/titulação: DOUTOR EM ENG. AGRÍCOLA			
Departamento / laboratório: CEDIA			
Cargo / Função: PROFESSOR			
Endereço Completo: RUA IRMÃO LUIZ CROEMBROECK 20/301			CEP: 37200000
Telefone (fixo e celular): 35 998323822		E-mail: rabelo@ufpa.br	
Nome completo: MARIA ALVES FERREIRA			
CPF: 008217516-03	RG: MG-6872313	Estado civil: SOLTEIRA	
Qualificação/titulação: DOUTORA EM FITOPATOLOGIA			
Departamento / laboratório: DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA			
Cargo / Função: PROFESSOR			
Endereço Completo: Praça Monsenhor Domingos Pinheiro, 79/203			CEP: 37200-203
Telefone (fixo e celular): (35)984136917		E-mail: mariaferreira@ufpa.br	
Nome completo: GABRIELLE AVELAR SILVA			
CPF: 10547971613	RG: MG 14376424	Estado civil: SOLTEIRA	
Qualificação/titulação: MESTRE EM AGRONOMIA/FITOPATOLOGIA			
Departamento / laboratório: DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA			
Cargo / Função: ALUNO			
Endereço Completo: RUA MATHEUS CARVALHO DE SOUZA, N°85, CENTRO			CEP: 37200-412
Telefone (fixo e celular): (35)38412318 (35)992600028		E-mail: gabi.as92@hotmail.com	
1.3 – Instituições externas envolvidas, se houver			
Nome completo:		CNPJ:	
2 - A INVENÇÃO			
Título da invenção: AGENTE BIOLÓGICO DE CICATRIZAÇÃO DE MATERIAIS A BASE DE CIMENTO CONTENDO ORGANISMOS QUE POSSUEM CELULOSE EM SUA CONSTITUIÇÃO.			
Linha de pesquisa: MATERIAIS NÃO CONVENCIONAIS			
Área técnica a que se refere / campo de utilização do produto/processo: ENGENHARIA CIVIL / CONSTRUÇÃO CIVIL			
A invenção é passível de produção industrial e comercialização? () NÃO (X) SIM			
A invenção se enquadra como: (X) Patente de invenção () Modelo de utilidade () Certificado de adição			

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA	
--	--	--

A presente invenção foi obtida em decorrência de um acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional ou conhecimento tradicional associado? (X) NÃO () SIM

Em caso afirmativo, informar o número e a data da Autorização/Cadastro do acesso correspondente e a origem do material genético e do conhecimento tradicional associado: -

Descreva o objeto da invenção de forma sucinta, apresentando suas características:

A presente invenção se trata de um produto para reparação de fissuras em estruturas e matérias a base de cimento. Consiste em dois componentes distintos, um contendo o agente biológico e outro contendo solução aquosa com solução nutritiva e aditivos. Mistura-se os dois componentes e aplica-se em regiões fissuradas. O agente biológico irá se desenvolver e gerar uma rede de micro e nano fibras de celulose dentro da fissura. Essa rede celulósica irá atrair umidade bem como íons cálcio, melhorando e acelerando o processo de cicatrização da matriz cimentícia, além de se entrelaçar com a matriz recém formada, funcionando como reforço.

Relacione as vantagens técnicas ou econômicas advindas da sua invenção, em relação à tecnologia disponível no momento:

Vantagens técnicas:

Diminuição no tempo de recuperação das estruturas e materiais em comparação com agentes disponíveis no mercado.

Ganho em durabilidade: as fissuras além de seladas serão mais resistentes, uma vez que possuem micro e nano reforços promovidos pela rede celulósica.

Utilização de matéria prima renovável para obtenção do produto.

Vantagens econômicas:

Baixo custo de produção e desenvolvimento dos organismos, diminuição dos custos de reparo e manutenção das estruturas e demais produtos à base de cimento.

3 – CITE 03 POSSÍVEIS EMPRESAS INTERESSADAS NA TECNOLOGIA

Nome da empresa: Silka	Nome da empresa: BASF	Nome da empresa: Braschem
E-mail:	E-mail:	E-mail:
Telefone:	Telefone:	Telefone:

4 - FINANCIAMENTO DA INVENÇÃO

O desenvolvimento da pesquisa que gerou a invenção foi financiado? Por qual órgão? NAO

Título do Projeto: -

Número do Termo de Outorga: -

Nome do Edital: -

Valor: -

5 - NOVIDADE DO INVENTO

5.1 - Houve divulgação do invento?

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA	
---	--	---

<input type="checkbox"/> Sim	<input checked="" type="checkbox"/> Não
De qual maneira?	
<input type="checkbox"/> Teses	
<input type="checkbox"/> Dissertações	
<input type="checkbox"/> Artigo Científico	
<input type="checkbox"/> Congresso / Seminário <input type="checkbox"/> Outros. Especificar: _____	
Data: __/__/____	
Local:	
Público-alvo:	

6 - DESCREVA A NOVIDADE PRESENTE NO INVENTO:

Atualmente existem diversos produtos empregados na restauração e reparação de estruturas de concreto. Porém, a novidade nesse produto será a utilização organismos biológicos que possuem celulose em sua estrutura, e que irão desenvolver e crescer dentro das fissuras, ao qual irão acelerar e otimizar o processo de cicatrização.

7. PALAVRAS-CHAVE/ KEY WORDS – para realização de busca de anterioridade:

Relacione os principais termos do invento e seus respectivos sinônimos, de forma a abarcar todo o conteúdo da invenção (em português e em inglês).

PALAVRAS-CHAVE		SINÔNIMOS	
PORTUGUÊS	INGLÊS	PORTUGUÊS	INGLÊS
Auto-cicatrização	Self healing	Auto-cura	Auto repair
Oomiceto Pythium	Oomiceto Pythium	Oomiceto Pythium	Oomiceto Pythium
Matriz Cimentícia	Cement Matrix	Pasta, Argamassa e Concreto	Paste, Mortar and Concrete

Obs: Caso seja necessário, inclua linhas e/ou colunas.

8 - DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO - utilize figuras e tabelas se necessário.

Os produtos e estruturas à base de cimento são um dos mais utilizados na construção civil, devido suas qualidades de fácil manuseio, boa resistência aos esforços de compressão além de seu baixo custo. Entretanto fissuras irão surgir com o decorrer do tempo, devido a processos de sobrecarga, dilatação térmica e fatores autógenos. Essas fissuras podem comprometer a estabilidade e durabilidade destes, e quando não houver o reparo adequado pode levar ao colapso. Visando mitigar esse problema, houve o desenvolvimento de produtos para facilitar esse processo de reparo, porém alguns não produzem resultado satisfatório e outros apresentam elevado custo financeiro. Então, com o intuito de reparar essas fissuras, em menor tempo e custo e ainda reforçar o local afetado e utilizar materiais renováveis, objetivou-se esse produto. A presente invenção deverá



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA



conter um agente biológico que produza ou possua celulose em sua composição e uma solução aquosa ou gelatinosa com material nutritivo e aditivos.

O produto será aplicado no local fissurado onde o organismo irá se desenvolver e produzir uma rede filamentosa de celulose que irá atrair o cálcio e sua alta porosidade facilita a penetração de CO_2 , consequentemente potencializando o processo de carbonatação, que é produção de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) que irá promover o fechamento da fissura, além de agir como um reforço na região fissurada. Outra situação acontece quando se tem uma matriz com alto consumo de cimento onde teoricamente se tem mais cimento anidro, neste caso a solução irá atuar não só apenas com a carbonatação, mas também com a reidratação dos grãos de cimento, tornando o processo de cicatrização ainda mais eficiente. Esse produto é aplicável em ambas as situações, quando se obtém uma matriz com baixo consumo de cimento, ela irá atuar apenas com o processo de carbonatação.

O procedimento para produção do produto consiste inicialmente em obter o micro-organismo. Neste caso foi escolhido *Oomieto Pythium sp.*, pois possui celulose em sua membrana celular. São realizadas três etapas até a versão final que é utilizada nas matrizes cimentícias. A primeira delas é a obtenção do *Pythium* em seu estado natural, onde é realizado o isolamento do mesmo diretamente do solo. O organismo é identificado morfologicamente, ou como nesse caso também por análise de DNA, através do exame de PCR. A segunda etapa consiste na replicação do *Pythium* em laboratório, utilizando o meio de cultura em estado sólido contendo seu alimento em formato industrializado, para essa função foi utilizado BDA (Batata, Dextrose e Ágar). Sabendo que esse alimento que é um carboidrato e que ele causa um retardamento na cura (endurecimento) das matrizes cimentícias, é necessário a adição de CaCl_2 juntamente ao meio de cultura. O CaCl_2 é utilizado como um catalizador que irá amenizar ao máximo o retardamento produzido pelo carboidrato e não deixará afetar o processo de cura das matrizes, após a preparação do meio é necessário adicionar uma pequena amostra retirado do isolamento feito em seu estado natural para que possa desenvolver no meio de cultura. Também é realizado ensaio para avaliar se organismo pode se desenvolver em ambiente alcalino, como é o meio cimentício.

A terceira e última etapa é replicação em meio líquido, onde é possível obter o micro-organismo em uma escala maior e de fácil extração e consequentemente menor perda de material. Após a produção em meio sólido inicia-se então essa etapa, onde é produzido o meio de cultura em estado líquido utilizando agora o BD (Batata e Dextrose) como fonte de alimento, dentro deste meio é adicionado cinco discos contendo amostras do micro-organismo que são extraídas da amostra produzida no meio de cultura em estado sólido, para que se desenvolva no meio líquido.

Para a realização dos processos executados nas etapas dois e três é necessário que a utilização de uma câmara de fluxo onde todo o processo de manuseio do micro-organismo deve ser feito, além da adição de um antibiótico nas soluções de meio de cultura para evitar contaminação por bactéria. Ao fim da terceira etapa obtém-se então o micro-organismo que será aplicado na matriz cimentícia, com isso é possível iniciar o processo de aplicação do mesmo nas matrizes.

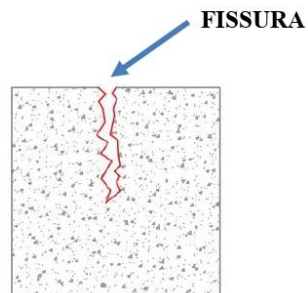
O organismo será armazenado em recipientes lacrados onde pode ficar por anos. Quando for aplicar na fissura de um material de matriz cimentícia, o organismo é retirado do recipiente, misturado em uma solução contendo BDA, CaCl_2 e no caso do *Pythium*, também antibiótico. Após a mistura será aplicado no local, e colocado um plástico por cima, para evitar perda de umidade. Após 7 dias começa a se observar o fechamento da fissura.

Para assegurar a eficiência do mecanismo de vedação de fissuras, corpos de provas, com fissuras induzidas, são aplicados o produto. E após 7, 14 e 28 dias, através de ensaios de carga, é reavaliada a recuperação de resistência dos corpos de provas.

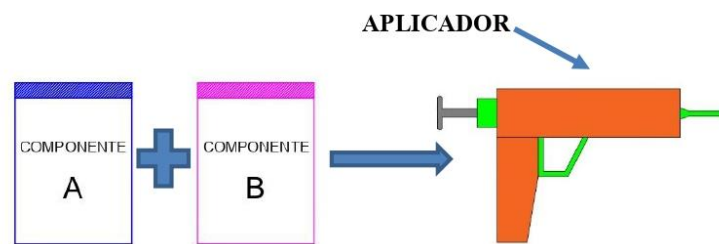
Aplicação do produto:

- (1) Identificação do local onde ocorreu uma fissura;
- (2) Mistura dos 2 componentes do produto, colocar o produto já com os 2 componentes misturados em um aplicador;
- (3) Aplicação do produto na fissura;
- (4) Após aplicação cobrir o local com um plástico protetor, para não ocorrer perda de umidade;
- (5) O microorganismo irá se desenvolver e preencher toda fissura.

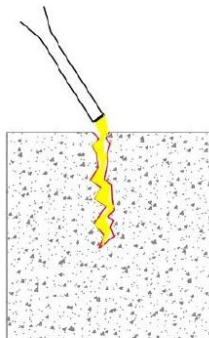
1)



2)

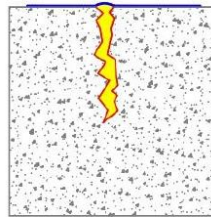


3)

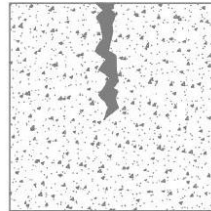


4)

PLÁSTICO PROTETOR



5)





DECLARAÇÃO DE CIÊNCIA E COMPROMETIMENTO

Declaro, para os devidos fins, que todas as informações descritas acima são verdadeiras. Além disso, comprometo-me em não divulgar resultados ou detalhes relativos a este pedido sem a prévia anuência do Nintec.

Comprometo-me, posteriormente, a auxiliar o Nintec em todas as solicitações bem como prestar quaisquer informações requisitadas por este, caso o depósito do pedido de patente seja efetuado.

Assinam os inventores (digitalmente, com ou sem certificado):

Lavras, 11/01/2021

Local e data

Nome: Saulo Rocha Ferreira

Assinatura:

Nome: Laércio Mesquita Júnior

Assinatura:

Nome: Diego Borges Silva

Assinatura:

Nome: Giovanni Francisco Rabelo

Assinatura:

Nome: Maria Alves Ferreira

Assinatura:

Nome: Gabrielle Avela Silva

Assinatura:

RELATÓRIO DESCRITIVO

1.1 - Título

AGENTE BIOLÓGICO DE CICATRIZAÇÃO DE MATERIAIS A BASE DE CIMENTO COM BASE EM MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS

1.2 - Apresentação do invento ou campo de aplicação

Os produtos e estruturas à base de cimento são um dos mais utilizados na construção civil devido suas qualidades de fácil manuseio, boa resistência aos esforços de compressão além de seu baixo custo. Entretanto, no decorrer de sua vida útil, podem surgir fissuras devido aos processos de sobrecarga, dilatação térmica e fatores autógenos, comprometendo a estabilidade estrutural; assim, se fazem necessárias reparações. Quando o reparo não é realizado ou executado de forma inadequada, pode ocorrer o colapso de toda estrutura. Também, exige-se que esses reparos sejam feitos em curto período de tempo por profissionais qualificados, pois muitas vezes tais fissuras podem não ser detectadas e porque a propagação delas pode acelerar o processo de degradação, o que gera altos custos financeiros, fator descrito por W. Du, J. Yu, Y. Gu, Y. Li, X. Han, Q. Liu, Preparation and application of microcapsules containing toluene-di-isocyanate for self-healing of concrete, **Constr. Build. Mater.** 202 (2019) 762–769.

A presente invenção se trata, neste contexto, de um produto para reparação de fissuras em estruturas e materiais a base de cimento. Ela consiste em dois componentes distintos, um contendo o agente biológico e outro contendo solução aquosa com solução nutritiva e aditivos que são misturados e aplicados em regiões fissuradas. O agente biológico irá se desenvolver e gerar uma rede de micro e nano fibras de celulose dentro da fissura que irá atrair umidade bem como íons cálcio (Ca^{2+}) melhorando e acelerando o processo de cicatrização da matriz cimentícia além de se entrelaçar com a matriz recém-formada, funcionando como reforço e, conseqüentemente reduzindo os custos de manutenção dos materiais que os contém.

1.3 - Estado da técnica

Existem no estado da técnica trabalhos que desenvolveram matrizes cimentícias que possuem a propriedade de auto cicatrização das fissuras sem que ocorra qualquer intervenção. São encontrados dois tipos de processos de auto cicatrização nestes estudos: autógena e autônoma, conforme relatado por N. De Belie, E. Gruyaert, A. Al-Tabbaa, P. Antonaci, C. Baera, D. Bajare, A. Darquennes, R. Davies, L. Ferrara, T. Jefferson, C. Litina, B. Miljevic, A. Otlewska, J. Ranogajec, M. Roig-Flores, K. Paine, P. Lukowski, P. Serna, J. Tulliani, S. Vucetic, J.Y. Wang, H.M. Jonkers, A review of self-healing concrete for damage management of structures, **Adv. Mater. Interfaces** (2018) 1800074.

O processo autógeno ocorre devido as próprias características intrínsecas dos materiais utilizados na matriz cimentícia que potencializam a hidratação residual dos grãos de cimento que ainda não foram hidratados e a carbonatação, que é a formação de carbonato de cálcio CaCO_3 , devido a reação do hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 com o dióxido de carbono CO_2 presente na

atmosfera, na presença de água. Este processo é descrito por vários autores: Haoliang Huang, Guang Ye, Denis Damidot, Effect of blast furnace slag on self-healing of microcracks in cementitious materials, **Cement and Concrete Research** 60 (2014) 68–82; M. Roig-Flores, F. Pirritano, P. Serna, L. Ferrara, Effect of crystalline admixtures on the self-healing capability of early-age concrete studied by means of permeability and crack closing tests, **Constr. Build. Mater.** 114 (2016) 447–457; Tanvir Qureshi, Antonios Kanellopoulos, Abir Al-Tabbaa, Autogenous self-healing of cement with expansive minerals-I: Impact in early age crack healing, **Construction and Building Materials** 192 (2018) 768–784; Guangyan Li, Xiaofeng Huang, Jiesheng Lin, Xiang Jiang, Xinya Zhang, activated chemicals of cementitious capillary crystalline waterproofing materials and their self-healing behaviour, **Construction and Building Materials** 200 (2019) 36–45.

Já o processo autônomo depende de agentes que não fazem parte da composição normal do cimento. Uma abordagem autônoma que mostra resultados muito promissores é a utilização de microrganismos que induzam o processo de auto cicatrização. Esse processo é alcançado pela incorporação de esporos de bactérias específicas dentro da matriz cimentícia junto com nutrientes que promovem seu desenvolvimento. Quando se inicia de fissuração, ocorrendo a penetração de água e oxigênio, os esporos germinam. Essas bactérias atuam como ponto de nucleação atraindo uma grande quantidade de Ca^{2+} que aceleram a precipitação de carbonato de cálcio CaCO_3 dentro das fissuras. Tal procedimento também foi descrito por alguns estudos: Hui Rong, Guanqi Wei, Guowei Mac, Ying Zhang, Xinguo Zheng, Lei Zhang, Rui Xu, Influence of bacterial concentration on crack self-healing of cementbased materials, **Construction and Building Materials** 244 (2020) 118372; Linzhen Tan, Bianca Reeksting, Veronica Ferrandiz-Mas, Andrew Heath, Susanne Gebhard, Kevin Paine, Effect of carbonation on bacteria-based self-healing of cementitious composites, **Construction and Building Materials** 257 (2020) 119501; Bingcheng Chen, Weiwei Sun, Xichen Sun, Chong Cui, Jianzhong Lai, Yang Wang, Jun Feng, Crack sealing evaluation of self-healing mortar with *Sporosarcina pasteurii*: Influence of bacterial concentration and air-entraining agent, **Process Biochemistry** Volume 107, August 2021, Pages 100-11.

Existem outras pesquisas que apontam o potencial da utilização da celulose como agente auto cicatrizante: Liberato Ferrara, Saulo Rocha Ferreira, Visar Krelani, Flavio Silva, Romildo Dias Toledo Filho, Effect of natural fibres on the self-healing capacity of high performance fibre reinforced cementitious composites, **SHCC3 3th RILEM International Symposium on Fiber Reinforced Concrete - BEFIB 03-05 November 2014, Dordrecht, The Netherlands**; Tamara Nunes da Cunha Moreira, Visar Krelani, Saulo Rocha Ferreira, Liberato Ferrara, Flávio de Andrade Silva, Romildo Dias Toledo Filho, Self healing assessment under tensile loads of ultra high performance fiber reinforced concrete (UHPRFC), **9th RILEM International Symposium on Fiber Reinforced Concrete - BEFIB 2016 19-21 September 2016, Vancouver, Canada**.

Já as patentes existentes relacionadas com o processo de auto cicatrização estão focadas na utilização de agentes, que são encapsulados e introduzidos durante a produção da matriz cimentícia, como demonstrado pelas patentes KR101782343B1 e US9493643B.

Também é conhecida a patente CN103880370A ao qual descreve um método de cicatrização que introduz cápsulas de que contenham esporos de bactérias como agentes de auto cicatrização.

1.3.1 - Problemas do estado da técnica:

Diversos estudos ou patentes já demonstraram, portanto, o uso de organismos para auto cicatrização de materiais cimentícios. Entretanto, até o momento não existem pesquisa que utilizam um micro-organismo que possa desenvolver e utilizar a celulose de sua estrutura para selar as fissuras.

A presente invenção caracteriza-se, neste contexto, pela utilização de conter um agente biológico que produza ou possua celulose em sua composição, uma solução aquosa ou gelatinosa com material nutritivo e aditivos.

1.3.2 - Vantagens da invenção:

O produto proposto será aplicado no local fissurado onde o organismo irá se desenvolver e produzir uma rede filamentosa de celulose que irá atrair o cálcio; sua alta porosidade facilita e penetração de CO₂ e conseqüentemente potencializará o processo de carbonatação que irá promover o fechamento da fissura além de agir como um reforço na região fissurada. Outra situação acontece quando se tem uma matriz com alto consumo de cimento onde teoricamente se tem mais cimento anidro; neste caso, a solução irá atuar não só apenas com a carbonatação, mas também com a reidratação dos grãos de cimento, tornando o processo de cicatrização mais eficiente. Esse produto é aplicável em ambas as situações pois quando se obtém uma matriz com baixo consumo de cimento, ela irá atuar apenas com o processo de carbonatação.

A invenção será uma forma eficiente, portanto de reduzir os custos relacionados aos reparos de estruturas fissuradas por meio do uso de organismos acessíveis e até mesmo, reforçar a estrutura com o produto resultante.

1.4 - Objeto da invenção

A presente invenção tem o objetivo de apresentação de um produto eficiente para reparação de fissuras em estruturas e materiais a base de cimento. Tal criação mistura-se um agente biológico com uma solução aquosa com solução nutritiva e aditivos a fim de criar uma rede de micro e nano fibras de celulose acelerando a cicatrização da matriz cimentícia e funcionando também como um reforço.

1.5 - Descrição da invenção

O procedimento para produção da invenção consiste inicialmente em obter o micro-organismo. Neste caso foi escolhido *Oomieto Pythium sp.*, pois possui celulose em sua membrana celular. São realizadas três etapas até a versão final que é utilizada nas matrizes cimentícias. A primeira delas é a obtenção do *Pythium* em seu estado natural, onde é realizado o isolamento do mesmo diretamente do solo. O organismo é identificado morfológicamente ou como nesse caso também por análise de DNA (ácido desoxirribonucleico), através do exame de PCR (proteína C reativa).

A segunda etapa consiste na replicação do *Pythium* em laboratório utilizando o meio de cultura em estado sólido contendo seu alimento em formato industrializado. Para essa função foi utilizado BDA (Batata, Dextrose e Ágar). Sabendo que esse alimento que é um carboidrato e que ele causa um retardamento na cura das matrizes cimentícias, é necessário a adição de CaCl_2 juntamente ao meio de cultura. O CaCl_2 é utilizado como um catalizador que irá amenizar ao máximo o retardamento produzido pelo carboidrato, contribuindo para não prejudicar a cura dos compósitos; após a preparação do meio é necessário adicionar uma pequena amostra retirada do isolamento feito, em seu estado natural, para que possa se desenvolver no meio de cultura. Também é realizado ensaio para avaliar se o organismo pode se desenvolver em ambiente alcalino, tal como o meio cimentício.

A terceira e última etapa é replicação em meio líquido, onde é possível obter o micro-organismo em uma escala maior e de fácil extração, reduzindo conseqüentemente a perda de material. Após a produção em meio sólido inicia-se então essa etapa onde se é produzido o meio de cultura em estado líquido utilizando agora o BD (Batata e Dextrose) como fonte de alimento; dentro deste meio são adicionados cinco discos contendo amostras do micro-organismo que são extraídos da amostra produzida no meio de cultura em estado sólido para que se desenvolva no meio líquido.

Para a realização dos processos executados nas etapas dois e três, é necessária a utilização de uma câmara de fluxo onde todo o processo de manuseio do micro-organismo é feito, além da adição de um antibiótico nas soluções de meio de cultura para evitar contaminação por bactéria. Ao fim da terceira etapa obtêm-se então o micro-organismo que será aplicado na matriz cimentícia.

O organismo deve ser armazenado em recipientes lacrados onde pode ficar por anos. Quando aplicado na fissura de um material de matriz cimentícia, o organismo é retirado do recipiente, misturado em uma solução contendo BDA, CaCl_2 , e no caso do *Pythium*, também com antibiótico. Posteriormente a mistura é aplicada no local desejado e recoberta por uma película plástica protetora evitando a perda de umidade. Após 7 dias o fechamento da fissura pode ser notado.

Para assegurar a eficiência do mecanismo de vedação de fissuras, o produto foi aplicado em corpos de provas com fissuras induzidas e após 7, 14 e 28 dias, através de ensaios de carga, são reavaliadas suas recuperações de resistência.

1.6 - Descrição das Figuras/Desenhos/Gráficos

FIGURA 1: Identificação do local onde ocorreu uma fissura;

FIGURA 2: Mistura dos 2 componentes do produto e colocação de ambos em um aplicador;

FIGURA 3: Aplicação do produto na fissura;

FIGURA 4: Recobrimento do produto com plástico protetor, evitando a perda de umidade.

FIGURA 5: Desenvolvimento do micro-organismo que preenche toda a fissura.

2 – REIVINDICAÇÕES

1. **USO DE ORGANISMO BIOLÓGICO QUE PRODUZA OU CONTENHA CELULOSE EM SUA ESTRUTURA EM PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO EM MATRIZES CIMENTÍCIAS**, conforme descrito no processo, **caracterizado pela** utilização de qualquer organismo que produza ou contenha celulose em sua estrutura e possa ser utilizado em qualquer material ou produto que utilize cimento ou seus compósitos.
2. **USO DE ORGANISMO BIOLÓGICO QUE PRODUZA OU CONTENHA CELULOSE EM SUA ESTRUTURA EM PROCESSOS DE APERFEIÇOAMENTO DE PROPRIEDADES FÍSICO-MECÂNICAS EM MATRIZES DE QUAISQUER MATERIAL COMPÓSITO**, conforme descrito no processo, a utilização de qualquer organismo que produza ou contenha celulose em sua estrutura e possa ser utilizado em qualquer material compósito.
3. **USO DOS ORGANISMOS**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, envolvendo a utilização destes organismos em todos os processos que envolvam a vedação, correção ou selagem de fissuras por processos de manutenção ativa ou passiva ou por auto cicatrização autônoma ou autógena.
4. **USO DO *OOMICETO PYTHIUM SP.*** Utilização de 5g do organismo triturado, água destilada (100ml), antibiótico (10mg), CaCl₂ (6g) e BD (6g) para aplicação como agente de cicatrização.
5. **USO DOS ORGANISMOS**, conforme a reivindicação 3; o agente de cicatrização pode conter um ou mais componentes contendo componentes a base de cálcio, carboidratos e aditivos para cimento.

6. **PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ORGANISMO BIOLÓGICO E AGENTES NUTRITIVOS** de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado por possuírem** produtos à base de celulose combinados com soluções nutritivas para aplicação em fissuras ou outros componentes.

3 - FIGURAS

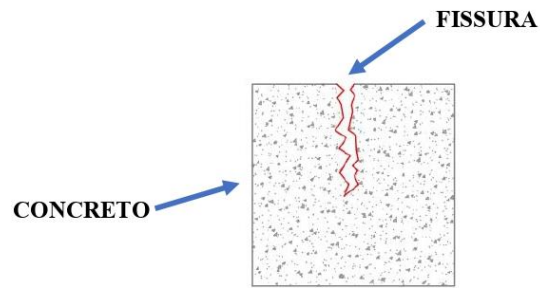


FIGURA 1

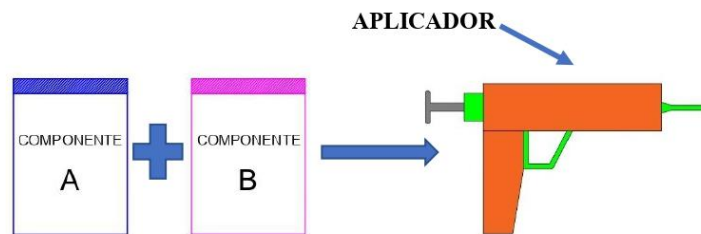


FIGURA 2

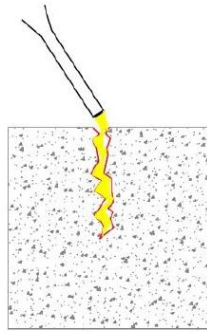
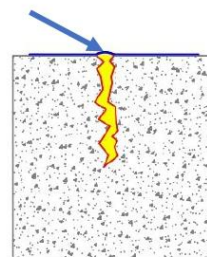


FIGURA 3

PLÁSTICO



PROTETOR

FIGURA 4

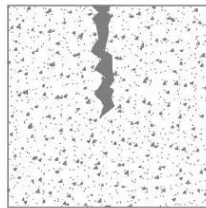


FIGURA 5

4 - RESUMO

AGENTE BIOLÓGICO DE CICATRIZAÇÃO DE MATERIAIS A BASE DE CIMENTO COM BASE EM MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS

Este trabalho tem o objetivo de produzir um produto constituído de uma mistura de um organismo que possua celulose em sua constituição e de soluções nutritivas com a finalidade de cicatrizar eficientemente materiais advindos de matrizes cimentícias. Os produtos à base de cimento são um dos elementos mais consumidos no mundo e pesquisas visando o aperfeiçoamento de suas propriedades, como de auto cicatrização de fissuras, são recorrentes. Dois métodos são observados na literatura visando este fim: autocicatrização autógena e autônoma. Entretanto, até o momento, não existem pesquisas dentro da linha de estudo da autocicatrização autônoma que utilizam um micro-organismo que possa desenvolver e utilizar a celulose de sua estrutura para selar as fissuras. Desse modo, a presente invenção surge como uma alternativa inovadora e eficiente que consiste em um agente biológico que é misturado com sua solução (Nutritiva +Aditivos) e aplicado na região fissurada e que gera uma rede de micro e nano fibras de celulose dentro da fissura. Essa rede celulósica atuará diretamente dentro da fissura melhorando e acelerando o processo de cicatrização da matriz cimentícia, além de agir também como um reforço na região fissurada. Deste modo, a utilização deste produto é extremamente importante principalmente no ponto de vista de segurança, trazendo não apenas a opção de selar as fissuras, mas também possibilitando a região fissurada a retomada de uma resistência se não igual, ainda maior, a de projeto, além de atuar também diretamente na questão econômica, possibilitando uma fácil manutenção, otimização de mão de obra, e eliminação de gastos com reparos e reforços nas estruturas.



06/10/2022 870220091557
10:33



29409161948848740

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 020202 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 22078679000174

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CAMPUS DA UFLA CX POSTAL 3037

Cidade: Lavras

Estado: MG

CEP: 37200-000

Pais: Brasil

Telefone: 3829.1127

Fax: 3829.1127

Email: nintec@nintec.ufla.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/10/2022 às 10:33, Petição 870220091557

Depositante 2 de 2**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DE MINAS GERAIS**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 21949888000183**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Órgão Público**Endereço:** AV. JOSÉ CÂNDIDO DA SILVEIRA, 1500, BAIRRO HORTO**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31035-536**Pais:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:**

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** AGENTE BIOLÓGICO DE CICATRIZAÇÃO DE MATERIAIS A BASE DE CIMENTO COM BASE EM MICROORGANISMOS FILAMENTOSOS**Resumo:** Esta patente tem o objetivo de produzir um produto constituído de uma mistura de um organismo que possua celulose em sua constituição e de soluções nutritivas com a finalidade de cicatrizar eficientemente materiais advindos de matrizes cimentícias. Os produtos à base de cimento são um dos elementos mais consumidos no mundo e pesquisas visando o aperfeiçoamento de suas propriedades, como de auto cicatrização de fissuras, são recorrentes. Dois métodos são observados na literatura visando este fim: autocicatrização autógena e autônoma. Entretanto, até o momento, não existem pesquisas dentro da linha de estudo da autocicatrização autônoma que utilizam um micro-organismo que possa desenvolver e utilizar a celulose de sua estrutura para selar as fissuras. Desse modo, a presente invenção surge como uma alternativa inovadora e eficiente que consiste em um agente biológico que é misturado com sua solução (Nutritiva +Aditivos) e aplicado na região fissurada e que gera uma rede de micro e nano fibras de celulose dentro da fissura. Essa rede celulósica atuará diretamente dentro da fissura melhorando e acelerando o processo de cicatrização da matriz cimentícia, além de agir também como um reforço na região fissurada. Deste modo, a utilização deste produto é extremamente importante principalmente no ponto de vista de segurança, trazendo não apenas a opção de selar as fissuras, mas também possibilitando a região fissurada a retomada de uma resistência se não igual, ainda maior, a de projeto, além de atuar também diretamente na questão econômica, possibilitando uma fácil manutenção, otimização de mão de obra, e eliminação de gastos com reparos e reforços nas estruturas.**Figura a publicar:** Fig 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7**Nome:** SAULO ROCHA FERREIRA**CPF:** 02700408381**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Dr. Delfino de Souza, 334 – Apt 603**Cidade:** Lavras**Estado:** MG**CEP:** 37200-122**Pais:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 2 de 7****Nome:** LAERCIO MESQUITA JÚNIOR**CPF:** 03509326628**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** RUA PRADRE FREDERICO BANGDER-21-CENTENÁRIO**Cidade:** Lavras**Estado:** MG**CEP:** 37203-612**Pais:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 3 de 7****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/10/2022 às 10:33, Petição 870220091557

Nome: DIEGO BORGES SILVA

CPF: 12755395648

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: RUA LÊONCIO ALVES CABRAL-77-CENTENÁRIO

Cidade: Lavras

Estado: MG

CEP: 37200-000

Pais: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 7

Nome: GIOVANNI FRANCISCO RABELO

CPF: 53026144649

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA IRMÃO LUIZ CROEMBROECK 20/301

Cidade: Lavras

Estado: MG

CEP: 37200-000

Pais: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/10/2022 às 10:33, Petição 870220091557

Nome: MARIA ALVES FERREIRA

CPF: 00821751603

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Praça Monsenhor Domingos Pinheiro, 79/203

Cidade: Lavras

Estado: MG

CEP: 37200-203

Pais: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 6 de 7

Nome: GABRIELLE AVELAR SILVA

CPF: 10547971613

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: RUA MATHEUS CARVALHO DE SOUZA, N°85,CENTRO

Cidade: Lavras

Estado: MG

CEP: 37200-412

Pais: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/10/2022 às 10:33, Petição 870220091557

Nome: EDUARDO HÉLIO DE NOVAIS MIRANDA

CPF: 07380794647

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Brilhantes, 203, Bairro Jardim Alvorada

Cidade: Boa Esperança

Estado: MG

CEP: 37170-000

Pais: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Contrato Social	1. Estatuto da UFLA.pdf
Portaria	2. Portaria de nomeação de reitor - JOÃO CHRYSOSTOMO.pdf
Portaria	3. PORTARIA FAPEMIG.pdf
Procuração	4. PROCURAÇÃO FAPEMIG.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	5. Comprovante de pagamento.pdf
Documento de Cessão	6. Declaração de inventor - Saulo.pdf
Documento de Cessão	7. Declaração de inventor - Laercio.PDF
Documento de Cessão	8. Declaração de inventor - Diego.pdf
Documento de Cessão	9. Declaração de inventor - Giovanni.PDF
Documento de Cessão	10. Declaração de inventor - Maria.PDF
Documento de Cessão	11. Declaração de inventor - Gabrielle.pdf
Documento de Cessão	12. Declaração de inventor - Eduardo.pdf
Contrato de trabalho	13. Declaração funcional - SauloRocha.pdf
Contrato de trabalho	14. Declaração funcional - Giovanni.pdf
Resumo	15. RESUMO.pdf
Relatório Descritivo	17. RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Desenho	16. FIGURAS.pdf
Reivindicação	18. REIVINDICAÇÕES.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/10/2022 às 10:33, Petição 870220091557

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/10/2022 às 10:33, Petição 870220091557