



FCTUC DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Utilização da biotecnologia para a estabilização de solos: Precipitação de CaCO_3 por via enzimática

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil na Especialidade de Geotecnia

Autor

João Paulo Sousa de Figueiredo Carmona

Orientadores

Paulo José da Venda Oliveira

Luís Joaquim Leal Lemos

Esta dissertação é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não tendo sofrido correções após a defesa em provas públicas. O Departamento de Engenharia Civil da FCTUC declina qualquer responsabilidade pelo uso da informação apresentada.

Coimbra, fevereiro, 2016

AGRADECIMENTOS

Ao terminar este trabalho não posso de deixar de expressar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que de algum modo contribuíram para a sua concretização. Assim, agradeço:

- ao Professor Doutor Paulo José da Venda Oliveira e ao Professor Doutor Luís Joaquim Leal Lemos pela orientação, participação, paciência e incentivo demonstrados na elaboração desta dissertação;
- aos restantes Professores da área de Geotecnia, que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a obtenção dos conhecimentos base da área imprescindíveis para a realização deste trabalho;
- ao Sr. José António, técnico do laboratório de Geotecnia DEC-FCTUC, pelo apoio na componente laboratorial do trabalho;
- ao Eng^o Nelson Duarte, do Instituto Pedro Nunes, pela colaboração na realização e interpretação dos testes XRD e SEM;
- ao meu tio, Professor Doutor João José Sousa da Faculdade de Farmácia da UC, pelas palavras de apoio e pela disponibilidade para ajudar na realização deste trabalho;
- à Professora Doutora Maria João Moreno e à Professora Doutora Maria Emília Azenha, do Departamento de Química da FCTUC, pelo esclarecimento de dúvidas no ramo da Química;
- ao Professor Doutor Rui Carvalho, do Departamento de Ciências da Vida, pelas dicas e partilha de conhecimento acerca do funcionamento da enzima *urease*;
- à Eng^a Maria João Bastos e à Sra. Dulce Pancas do Departamento de Engenharia Química da FCTUC;
- aos amigos e colegas de Geotecnia, em especial à Andreia Vieira, ao Manuel Porém, à Liliana Relvão, à Vera Matias, ao Manuel Silva e ao Luís Freitas;
- aos amigos e colegas de Engenharia Civil que me acompanharam ao longo do curso, em especial ao Joel Correia, ao Vítor Calado, ao Vítor Costa, ao Diogo Freitas, ao Rodrigo Esteves e ao Paulo Marques;
- à minha família, aos meus pais e irmãos e avô por serem enormes, e não me estou a referir à altura, e pelo apoio emocional e financeiro durante esta etapa da minha vida.

A todos o meu sincero OBRIGADO!

RESUMO

A utilização de solos com fracas propriedades geotécnicas geralmente requer a melhoria das suas características naturais. Uma das técnicas de melhoramento de solos mais promissoras num futuro próximo é a sua estabilização através da precipitação do carbonato de cálcio (CaCO₃), designada também por biocalcificação ou bioestabilização. Este processo é normalmente efetuado com a introdução exógena da bactéria *Sporosarcina pasteurri* de maneira a promover a hidrólise da ureia por via da enzima *urease*.

De maneira a contornar a complexidade do processo de cultivo e armazenamento de bactérias, que habitualmente necessita de condições ambientais especiais, neste estudo utiliza-se um método alternativo para promover a precipitação do carbonato e cálcio. Assim, é feita a precipitação de CaCO₃ por via enzimática, onde se mistura o solo com uma solução aquosa que contém os reagentes ureia e cloreto de cálcio e a enzima *urease*.

Este trabalho visa estudar o efeito da combinação de diversas quantidades da enzima *urease* e dos reagentes no processo de biocalcificação de um saibro recolhido na cidade de Leiria.

Numa primeira fase, este método é experimentado em tubos de ensaio, na ausência de solo, de maneira a quantificar a precipitação de CaCO₃, fazendo variar a dosagem de enzima *urease*, a concentração de ureia-CaCl₂ e o tempo de reação de precipitação, por forma a definir o ensaio base para a aplicação em provetes de solo. O material precipitado é ainda sujeito a testes XRD.

Posteriormente, o processo repete-se com a inclusão do solo, num meio poroso, onde os parâmetros objeto de estudo são a dosagem de enzima *urease*, a concentração de ureia-CaCl₂, o tempo de cura, o teor em solução estabilizadora, e as condições de cura (câmara termohigrométrica e ambiente). O fortalecimento do solo bioestabilizado é avaliado através de ensaios de compressão simples não confinados. Nesta fase foram também realizados testes SEM e XRD em amostras de solo bioestabilizado.

Assim, adicionando aos provetes de solo 4 kU/L de *urease*, 0,75 mol/L de ureia-CaCl₂, num volume de solução equivalente ao teor ótimo do ensaio Proctor normal, e com 28 dias de cura em câmara húmida, observa-se uma duplicação da resistência e rigidez do solo, através do processo de biocalcificação, face ao material não estabilizado.

ABSTRACT

Soils with poor geotechnical properties generally require the improvement of their natural characteristics. One of the most promising future techniques to improve the characteristics of natural soils is the microbial induced calcium carbonate precipitation (CaCO₃), also known as biocalcification or biostabilization. The microbial induced CaCO₃ precipitation in porous soils usually occurs by adding the exogenous bacterium *Sporosarcina pasteurii* to promote urea hydrolysis via the enzyme *urease*.

In order to avoid the complex process of the cultivation and storage of bacteria, which frequently requires special environments, an alternative method to promote the CaCO₃ precipitation in a porous medium, is the enzymatic CaCO₃ precipitation, which is performed by mixing the soil with an aqueous solution containing urea, calcium chloride and the *urease* enzyme.

This study discusses the effect of combining different amounts of *urease* enzyme and reagents in biocalcification process of a sandy soil collected in the city of Leiria.

In a first step, this method has been carried in test tubes, without soil, in order to quantify the precipitation of CaCO₃ by varying the amount of *urease* enzyme, concentration of urea CaCl₂ and the reaction time, with development of the test model for the soil specimen. The precipitated material is analyzed using XRD technique.

Afterwards the process is repeated with the soil, a porous medium, where the parameters under study are the amount of *urease* enzyme, the concentration of urea CaCl₂, the curing time, the concentration of stabilizer solution and the curing conditions (hygrothermal chamber and ambient). The strengthening of biostabilized soil is evaluated by unconfined compressive tests. At this stage, SEM and XRD tests were performed on the biostabilized soil samples.

It has been observed that by adding to the soil samples 4 kU/L *urease*, 0,75 mol/L urea-CaCl₂, in a volume of solution equal to the optimal moisture content determined by normal Proctor test, and 28 curing days in a hygrothermal chamber, is possible to obtain the doubling of the strength and stiffness of the soil occurred, through biocalcification process when compared with the unstabilized material.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE QUADROS	x
SIMBOLOGIA	xi
ABREVIATURAS	xii
1 Introdução	1
1.1 Objetivo da dissertação	2
1.2 Estrutura da dissertação	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Precipitação de CaCO ₃ com recurso à biotecnologia	4
2.1.1 Biomineralização	4
2.1.2 Catálise enzimática: <i>urease</i>	5
2.1.3 Aplicações da precipitação de CaCO ₃ na Engenharia Civil	5
2.2 Bioestabilização de solos	7
2.2.1 Precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente.....	7
2.2.2 Precipitação de carbonato de cálcio via enzimática	12
3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	18
3.1 Caracterização geotécnica do solo	18
3.1.1 Composição granulométrica	18
3.1.2 Densidade das partículas sólidas	20
3.1.3 Limites de consistência.....	20
3.1.4 Ensaio de compactação.....	20
3.1.5 Teor em matéria orgânica	21
3.1.6 Medição do pH	21
3.2 Produtos envolvidos na precipitação de CaCO ₃	22
3.2.1 Água	22
3.2.2 Ureia	22
3.2.3 Cloreto de cálcio.....	22
3.2.4 Enzima <i>urease</i>	22

3.2.5	Solução tampão de fosfato de sódio	23
4	PROCEDIMENTO LABORATORIAL.....	24
4.1	Introdução	24
4.2	Precipitação de CaCO ₃ em tubos de ensaio	24
4.2.1	Aparelhos e utensílios.....	24
4.2.2	Procedimento de ensaio	25
4.2.3	Tratamento de dados.....	26
4.3	Preparação dos provetes de solo	27
4.3.1	Aparelhos e utensílios.....	27
4.3.2	Preparação da solução estabilizadora	27
4.3.3	Características dos provetes.....	28
4.3.4	Procedimento utilizado em provetes compactados.....	28
4.3.5	Procedimento utilizado em provetes sujeitos a percolação ascendente.....	30
4.3.6	Condições de cura dos provetes de solo	30
4.4	Ensaio de Compressão Simples (UCS)	31
4.4.1	Procedimento de ensaio	31
4.4.2	Tratamento de dados.....	32
4.5	Ensaio SEM e XRD.....	32
4.6	Plano de ensaios	33
4.6.1	Precipitação de CaCO ₃ em tubos de ensaio.....	33
4.6.2	Provetes de solo compactados	33
4.6.3	Provetes com percolação ascendente no solo	35
5	ANÁLISE DE RESULTADOS	36
5.1	Introdução	36
5.2	Precipitação de CaCO ₃ em tubos de ensaio	36
5.3	Provetes compactados com cura em câmara húmida.....	39
5.3.1	Varição da quantidade de <i>urease</i>	41
5.3.2	Varição da concentração de ureia-CaCl ₂	42
5.3.3	Varição do tempo de cura	43
5.3.4	Varição do teor em solução estabilizadora	44
5.3.5	Varição do pH.....	46
5.4	Provetes compactados com cura em ambiente	47
5.4.1	Varição da quantidade de ureia-CaCl ₂	47
5.4.2	Varição do teor em solução estabilizadora	48
5.4.3	Varição da quantidade de <i>urease</i>	49
5.4.4	Varição do tempo de cura	50
5.5	Provetes sujeitos a percolação ascendente.....	52
5.5.1	Condição de cura em câmara húmida.....	52
5.5.2	Condição de cura em ambiente.....	55

5.6	Comparação com outros trabalhos.....	56
6	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	58
6.1	Conclusões	58
6.2	Propostas para trabalhos futuros	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Modelo de chave-e-fechadura: especificidade de uma enzima pelas moléculas de substrato (http://webpages.fc.ul.pt/~rfcruz/relats/reltlb07.html)	5
Figura 2.2 – MICP em coluna de areia com 5 metros de altura: a) quantidade de precipitado e força de compressão ao longo da altura da coluna; b) variação da permeabilidade ao longo da altura da coluna. (Whiffin <i>et al.</i> , 2007).....	8
Figura 2.3 – Ensaio de campo de bioestabilização: a) vista superior com fluxo de injeções; b) volume de solo no final do melhoramento (van Paassen <i>et al.</i> , 2010a).....	9
Figura 2.4 – Efeito do tempo de cura na eficiência das bactérias <i>I. insulissalae</i> ou <i>S. pasteurii</i> : (a) evolução de q_u e Eu_{50} ; (b) evolução de q_t (Venda Oliveira <i>et al.</i> , 2015).	10
Figura 2.5 – Efeito da concentração de bactérias <i>I. insulissalae</i> : (a) evolução de q_u e Eu_{50} ; (b) evolução de q_t . (Venda Oliveira <i>et al.</i> , 2015).	11
Figura 2.6 – Efeito do tempo de reação na concentração de CaCO ₃ : a) efeito da concentração de <i>urease</i> ; b) efeito da temperatura. (Nemati <i>et al.</i> , 2003).	13
Figura 2.7 – Relação entre a concentração de <i>urease</i> e a percentagem de precipitação de CaCO ₃ para concentrações de 0,5 e 1,0 mol/L de ureia-CaCl ₂ (Neupane <i>et al.</i> , 2013)....	13
Figura 2.8 - Areia de Toyoura bioestabilizada: a) curvas de tensão-extensão UCS; b) quantidade de reagentes, q_u e Eu_{50} de cada amostra (Yasuhara <i>et al.</i> , 2012).....	14
Figura 2.9 – Amostra de solo bioestabilizado por via enzimática: a) ensaio SEM; b) ensaio XRD (Yasuhara <i>et al.</i> , 2012).....	14
Figura 2.10 – Condutividade hidráulica vs quantidade de CaCO ₃ (Yasuhara <i>et al.</i> , 2012)	15
Figura 2.11 – Bioestabilização de areia de sílica: material bioestabilizado no provete metálico e preparação de provetes cilíndricos para ensaios UCS. (Neupane <i>et al.</i> , 2015). 15	15
Figura 2.12 – Bioestabilização de areia de sílica: a) curvas de tensão-extensão UCS; b) Resultado de ensaio XRD no material melhorado (Neupane <i>et al.</i> , 2015).....	16
Figura 2.13 – Bioestabilização de areia de sílica: Distribuição da percentagem de calcite num plano que passa no centro do tubo metálico (Neupane <i>et al.</i> , 2015).	16
Figura 2.14 – Comparação entre MICP e EMCP (Neupane <i>et al.</i> , 2015)	17
Figura 3.1 – Local de extração do solo em estudo (Costa, 2012).....	18
Figura 3.2 – Curva granulométrica para o solo em estudo.....	19
Figura 3.3 – Representação gráfica do ensaio Proctor. Destaque do teor em humidade ótimo e respetivo peso volúmico seco do solo máximo.	21

Figura 4.1 – Figura ilustrativa do procedimento de ensaio para a quantificação de CaCO ₃ em tubos de ensaio, procedimento adaptado de Neupane <i>et al.</i> (2013).....	25
Figura 4.2 – Aspeto dos tubos de ensaio após reação de precipitação de CaCO ₃	26
Figura 4.3 – Esquema ilustrativo do procedimento de compactação dos provetes.	29
Figura 4.4 – Esquema ilustrativo da percolação ascendente.	30
Figura 4.5 – Aspeto da realização de um ensaio UCS.....	31
Figura 5.1 – Quantificação de CaCO ₃ precipitado em tubos de ensaio: Influência da quantidade de <i>urease</i> com a concentração de ureia-CaCl ₂	37
Figura 5.2 – Quantificação de CaCO ₃ precipitado em tubos de ensaio: Influência do tempo de reação com a concentração de ureia-CaCl ₂	37
Figura 5.3 – Quantificação de CaCO ₃ precipitado em tubos de ensaio: Influência do tempo de reação e da quantidade de <i>urease</i> com a concentração de ureia-CaCl ₂	38
Figura 5.4 – Resultados de ensaio XRD em amostras de tubo de ensaio.....	39
Figura 5.5 – Ensaio UCS: Evolução de q _u e E _{u50} com a variação da quantidade de <i>urease</i> ..	41
Figura 5.6 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão axial para o subplano B.	42
Figura 5.7 – Ensaio UCS: Evolução de q _u e E _{u50} com a variação de ureia-CaCl ₂	42
Figura 5.8 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão para o subplano D.	43
Figura 5.9 – Ensaio UCS: Evolução de q _u e E _{u50} com a variação do tempo de cura.	43
Figura 5.10 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão para o subplano C.	44
Figura 5.11 – Ensaio UCS: Evolução de q _u e E _{u50} com o teor em solução.....	45
Figura 5.12 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão para o subplano A.	45
Figura 5.13 – Ensaio XRD do solo natural e do solo bioestabilizado (proвете A_16_2)	46
Figura 5.14 – Evolução do pH com a concentração de ureia-CaCl ₂	46
Figura 5.15 – Evolução de q _u com o pH para o ensaio base e subplanos B e C.....	47
Figura 5.16 – Ensaio UCS: Evolução de q _u e E _{u50} com a concentração de ureia-CaCl ₂	48
Figura 5.17 – Ensaio UCS: Evolução do q _u e do E _{u50} com o teor em solução estabilizadora.	48
Figura 5.18 – Ensaio UCS: Evolução do q _u e do E _{u50} com a quantidade de <i>urease</i>	49
Figura 5.19 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão axial para o subplano B.....	50
Figura 5.20 – Ensaio UCS: Evolução do tempo de cura: a) evolução de q _u e E _{u50} ; b) curva de tensão-extensão axial.	50
Figura 5.21 – Imagem SEM do solo estabilizado para 28 dias de cura (proвете C_28_2)	51
Figura 5.22 – Imagens SEM e análises químicas do solo estabilizado para 28 dias de cura (proвете C_28_2).....	52
Figura 5.23 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão axial para os provetes submetidos a percolação.	53
Figura 5.24 – a) Tubos de ensaio com precipitação de CaCO ₃ b) Tubos de ensaio com precipitação de CaCO ₃ após agitar c) Ensaio XRD para amostra de CaCO ₃ sobrenadante.	54

Figura 5.25 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com a quantidade de <i>urease</i> nas soluções percoladas com concentração de 0,25 e 0,75 mol/L.	55
Figura 5.26 – Relação entre o q_u e o teor em humidade após ensaio UCS dos provetes submetidos a percolação.	56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 4.1 – Plano de ensaio para a precipitação de CaCO_3 em tubos de ensaio	33
Quadro 4.2 - Plano de ensaios dos provetes compactados.	34
Quadro 4.3 - Plano de ensaios dos provetes sujeitos a percolação.....	35
Quadro 5.1 – Resumo dos resultados dos ensaios UCS com cura em câmara húmida.	40
Quadro 5.2 – Resumo de ensaio UCS para o subplano de percolação.....	53

SIMBOLOGIA

A_{corr}	– Área transversal do provete corrigida tendo em conta a deformação radial
D	– Diâmetro dos provetes
E_{u50}	– Módulo de deformabilidade para 50% da carga de rotura
F	– Força medida na célula de carga
G_s	– Densidade das partículas sólidas
h	– Altura do provete
q_u	– Tensão obtida para o ensaio UCS
$q_u^{\text{máx}}$	– Resistência máxima ou tensão de rotura obtida para o ensaio UCS
w	– Teor em água
w_{inicial}	– Teor em água na preparação do provete
w_{final}	– Teor em água no final do ensaio UCS
pH	– Potencial hidrogeniónico
V	– Volume
C	– Concentração molar
M	– Massa molar
m_e	– Massa de CaCO_3 obtida experimentalmente
m_t	– Massa teórica de CaCO_3
$\Delta\delta_v$	– Variação do deslocamento vertical
ϵ_a	– Extensão axial
γ_d	– Peso volúmico seco do solo

Simbologia das equações químicas

CaCl_2	– Cloreto de cálcio	H_2CO_3	– Ácido carbónico
CaCO_3	– Carbonato de cálcio	H_2O	– Água
Ca^{2+}	– Ião cálcio	HCO_3^-	– Ião bicarbonato
Cl^-	– Ião cloreto	NH_2COOH	– Ácido carbâmico
CO_2	– Dióxido de carbono	NH_3	– Amónia
CO_3^{2-}	– Ião carbonato	NH_4^+	– Ião amónio
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	– Ureia	OH^-	– Ião hidróxido
H^+	– Ião hidrogénio		

ABREVIATURAS

ASTM	– <i>American Society for Testing and Materials</i>
BS	– <i>British Standards</i>
DEC	– Departamento de Engenharia Civil da Universidade de Coimbra
EMCP	– <i>Enzyme Mediated Calcite Precipitation</i>
EN	– Norma Europeia (<i>European Standard</i>)
FCTUC	– Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
ICDD	– <i>International Center for Diffraction Data</i>
IPN	– Instituto Pedro Nunes
LNEC	– Laboratório Nacional de Engenharia Civil
MBC	– Mineralização Biologicamente Controlada
MBI	– Mineralização Biologicamente Induzida
MICP	– <i>Microbially Induced Calcite Precipitation</i>
NP	– Norma Portuguesa
OCDE	– Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
ONU	– Organização das Nações Unidas
PVC	– Policloreto de Vinilo
SEM	– <i>Scanning Electron Microscope</i>
UC	– Universidade de Coimbra
UCS	– Ensaio de Compressão simples uniaxial (<i>Unconfined Compressive Strength</i>)
XRD	– <i>X-ray Diffraction</i>

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional, as sociedades tendem a proliferar e a reorganizar-se em cidades. Em regiões onde a expansão está limitada pelas fronteiras geográficas e pelas condições inadequadas do uso do solo, associadas às exigências de qualidade de vida e do desenvolvimento humano, tem-se observado uma crescente ocupação de alguns maciços terrosos, outrora não recomendados para a construção. De maneira a acompanhar esta evolução, é necessário melhorar e reforçar esses solos para garantir o seu bom comportamento mecânico e hidráulico, com processos minimizadores dos impactes ambientais, designadamente, com recurso à biotecnologia.

As técnicas de melhoramento e reforço de solos podem simplificarmente dividir-se em técnicas de reforço e em técnicas de melhoramento (Cardoso, 1987). As primeiras estão relacionadas com a introdução de elementos resistentes como pregagens, ancoragens, estacas, etc., tendo um efeito estrutural que aumenta a resistência do maciço às solicitações submetidas. As segundas, técnicas de melhoramento ou de estabilização, dizem respeito à alteração de pelo menos uma das propriedades intrínsecas do solo, podendo o efeito do tratamento do solo ser temporário ou permanente, de natureza química, física ou mecânica. Incluem-se neste grupo técnicas como os drenos verticais, a compactação, a pré-carga ou o *deep mixing* (Correia, 2011).

A escolha da técnica de melhoramento e reforço a adotar deve procurar otimizar o compromisso técnico-económico, tendo em consideração o impacte ambiental causado. Repare-se que hoje em dia existem fortes pressões para mitigar a degradação ambiental. Este facto pode ser justificado pelo aumento do nível médio das águas do mar, derivado do aquecimento global, originado sobretudo pela libertação de CO₂ na queima de combustíveis fósseis. Um dos grandes responsáveis deste problema é a produção de cimento Portland, material usado com abundância na construção civil, incluindo na estabilização de solos (DeJong *et al.*, 2010). A substituição parcial do cimento Portland por técnicas mais amigas do ambiente pode reduzir significativamente as emissões de gases tóxicos (Hamdan *et al.*, 2013). Ainda na ótica ambiental, torna-se imperioso aproveitar os materiais existentes no local da obra, independentemente da sua qualidade ou adequabilidade ao projeto em questão (Correia, 2011), por exemplo, promovendo a melhoria de solos para camadas de pavimento com recurso à biotecnologia. O aproveitamento dos processos biológicos nos solos promete ser a próxima prática revolucionária na engenharia geotécnica (DeJong *et al.*, 2013).

A abordagem científica do problema exposto anteriormente, conjugada com a interdisciplinaridade da biologia, da química e da engenharia civil, suscitou o engenho humano que conduziu ao aparecimento de modernas técnicas de melhoramento e reforço de solos. É neste contexto que surgem técnicas de melhoramento ou estabilização química com recurso à biotecnologia, denominadas bioestabilização ou biocalcificação.

A bioestabilização por precipitação de CaCO₃ com catálise microbiológica é um tema relativamente recente. Repare-se que um dos primeiros trabalhos publicados, para a obtenção de grau académico de doutoramento, foi realizado por Whiffin (2004), apontando a técnica como uma nova técnica de melhoramento de solos granulares. Desde essa data, vários autores têm desenvolvido o conhecimento na área (van Paassen, 2009; DeJong *et al.*, 2013). Após 2012, surge a alternativa ao tema exposto que passa por uma catálise da referida reação de precipitação por via enzimática (Yasuhara *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2013). É neste contexto que surge o presente trabalho.

1.1 Objetivo da dissertação

O presente trabalho tem como objetivo central o estudo da influência da enzima *urease* e do substrato envolvido na precipitação de CaCO₃ na resistência mecânica de um solo arenoso. Essa resistência é avaliada através de ensaios de resistência à compressão simples não confinados.

Baseado em Costa (2012) e Venda Oliveira *et al.* (2015), em que foi comparado o uso de duas bactérias no processo de precipitação de carbonato de cálcio, e ciente dos avanços propostos por Yasuhara *et al.* (2012) e Neupane *et al.* (2013), tendo substituído as bactérias por enzimas, procura-se neste trabalho estudar em laboratório o melhoramento do solo por via enzimática, adicionando um volume de solução estabilizadora equivalente ao teor ótimo de compactação obtido no ensaio Proctor normal.

1.2 Estrutura da dissertação

Após o presente capítulo introdutório, que pretende enquadrar o leitor na dissertação, seguir-se-ão cinco capítulos que pormenorizarão o trabalho efetuado.

No capítulo 2 pretende-se efetuar o ponto de situação da matéria, o estado de conhecimento e as investigações consideradas mais relevantes na temática da bioestabilização. Assim, serão apresentadas as principais ideias decorrentes dos estudos relevantes efetuados nesta área. Neste capítulo são abordados cinco estudos laboratoriais da técnica de bioestabilização. Apresenta-se, relativamente à técnica por ação de microrganismos, um dos primeiros estudos realizados na área, Whiffin *et al.* (2007), uma aproximação de ensaio de campo, van Paassen *et al.* (2010a), e um trabalho desenvolvido no DEC-FCTUC, Venda Oliveira *et al.* (2015). Relativamente à

referida técnica por via enzimática, abordam-se os avanços protagonizados por Yasuhara *et al.* (2012) e Neupane *et al.* (2015).

No capítulo 3 proceder-se-á à caracterização e descrição dos materiais utilizados na parte laboratorial desta dissertação. Inclui a caracterização geotécnica do solo arenoso, onde as características de identificação analisadas são a composição granulométrica, a densidade das partículas sólidas, os limites de consistência, o ensaio de compactação, o teor em matéria orgânica e o pH do solo. Nesta parte, identificam-se, também, os elementos envolvidos no processo de precipitação do carbonato de cálcio: água, ureia, cloreto de cálcio, enzima urease e a solução tampão de fosfato de sódio.

O capítulo 4 inclui a descrição do procedimento experimental dos ensaios elementares realizados. Refere ainda o plano de ensaios que compreende a componente laboratorial, bem como os métodos e processos de tratamento de dados.

O capítulo 5 contempla a apresentação, análise e discussão dos resultados obtidos para cada tipo de ensaio laboratorial praticado, bem como a comparação com outros trabalhos realizados.

Finaliza-se o trabalho, no capítulo 6, com a apresentação das principais conclusões resultantes da investigação laboratorial desenvolvida, indicando-se algumas sugestões de trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Precipitação de CaCO₃ com recurso à biotecnologia

A OCDE, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico, definiu a biotecnologia como a aplicação de princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais, através de agentes biológicos, para fornecer produtos e serviços (Bull *et al.*, 1982). Segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica da ONU (Organização das Nações Unidas) a biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica.

É no seguimento da definição de biotecnologia que se entende que a sua interdisciplinaridade promove um desenvolvimento tecnológico com aplicação prática em diversas áreas, incluindo na engenharia civil. Uma dessas aplicações é a biomineralização de carbonato de cálcio (CaCO₃) com recurso à biotecnologia. O aproveitamento dos processos biológicos nos solos promete ser a próxima prática revolucionária na engenharia geotécnica (DeJong *et al.*, 2013).

2.1.1 Biomineralização

O termo biomineralização representa os processos coletivos pelos quais os organismos formam minerais (Bazylinski *et al.*, 2003). Esta síntese de minerais é amplamente classificada por Lowenstam *et al.* (1988) em duas classes: mineralização biologicamente controlada (MBC) e mineralização biologicamente induzida (MBI).

Na MBC os organismos usam a atividade celular para controlar, num ambiente isolado, a nucleação, crescimento, morfologia e localização final do mineral depositado. Este processo pode ocorrer extra, inter ou intracelularmente. Um exemplo de MBC extracelular são as conchas de moluscos.

Na MBI os organismos, principalmente microrganismos, secretam um ou mais produtos metabólicos que reagem com iões ou compostos do meio físico envolvente resultando na deposição subsequente de partículas minerais como subprodutos metabólicos (Lowenstam *et al.*, 1988). Nesta classe engloba-se a produção microbiológica de carbonato de cálcio, visto ser um processo altamente dependente das condições do meio envolvente (De Muyneck *et al.*, 2010).

2.1.2 Catálise enzimática: *urease*

Chang (2005) afirma que entre todos os processos complexos que se desenvolvem nos organismos vivos, nenhum é mais espantoso ou mais essencial que a catálise enzimática. As enzimas são catalisadores biológicos, i.e. aumentam a velocidade das reações bioquímicas. O autor explica que as enzimas atuam apenas sobre certas moléculas chamadas substratos (ou seja, reagentes), deixando inalterado o resto do sistema. A catálise enzimática é em geral homogénea, pois o substrato e a enzima estão presentes em solução aquosa. Chang (2005) denota que uma célula viva pode conter cerca de 3000 enzimas diferentes, catalisando uma reação específica, na qual um substrato é convertido nos produtos apropriados, sendo portanto uma relação chave-e-fechadura (Figura 2.1).

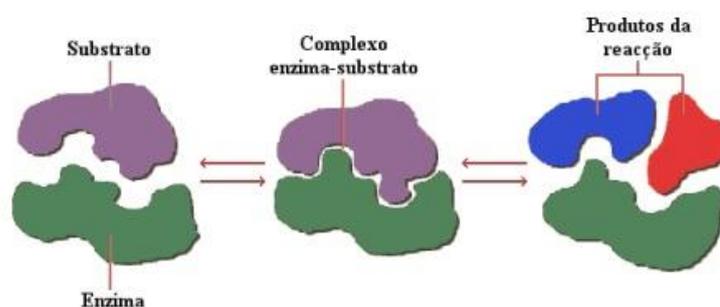


Figura 2.1 – Modelo de chave-e-fechadura: especificidade de uma enzima pelas moléculas de substrato (<http://webpages.fc.ul.pt/~rfcruz/relats/reltlb07.html>)

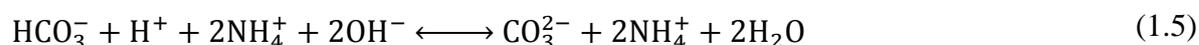
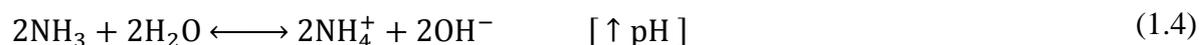
Sumner (1926) demonstrou que a *urease* é uma proteína, tendo sido o primeiro a isolar esta enzima, proveniente de uma variedade de feijão tropical denominada *Canavalia Ensiformis*, sobre uma forma cristalizada. A *urease* pode ser encontrada em numerosas plantas, bactérias e fungos (Al-Thawadi, 2011). A *urease* é a enzima que catalisa a hidrólise da ureia, produzindo amónia e dióxido de carbono (Sumner, 1926).

2.1.3 Aplicações da precipitação de CaCO₃ na Engenharia Civil

Um dos tipos mais comuns de reações que ocorrem em solução aquosa é a reação de precipitação. Esta é caracterizada pela formação de um produto insolúvel ou precipitado, i.e. um sólido insolúvel que se separa da solução (Chang, 2005).

A precipitação de carbonato de cálcio pode ser induzida por vários processos, entre os quais se destacam: por hidrólise da ureia (Benini *et al.*, 1999; Ciurli *et al.*, 1999); por desnitrificação (Karatas *et al.*, 2008; Van Paassen *et al.*, 2010b); por redução de sulfato, induzindo a precipitação de dolomite (Warthmann *et al.*, 2000); por redução de ferro, induzindo a precipitação de anquerita e de outros minerais (Roden *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática da ureia é o processo de precipitação de CaCO₃ mais eficiente em termos energéticos dos referidos anteriormente (DeJong *et al.*, 2010), e sobre o qual se centra o presente estudo. Este pode ser descrito pelas seguintes equações químicas (Hammes *et al.*, 2003), em que a enzima *urease* catalisa a hidrólise da ureia, CO(NH₂)₂, originando uma molécula de amónia e uma de ácido carbâmico (Equação 1.1). Este último decompõe-se espontaneamente formando uma mole adicional de amónia e uma mole de ácido carbónico (Equação 1.2). O ácido carbónico equilibra em água originando o bicarbonato e o ião hidrogénio (Equação 1.3), assim como as duas moléculas de amónia que formam 2 moles de amónio e dois iões hidróxido (Equação 1.4). Este último promove um aumento do pH, permitindo a formação de iões carbonato (Equação 1.5).



Estando os iões carbonato na presença de iões de cálcio (provenientes do cloreto de cálcio, por exemplo), a produção de carbonato de cálcio inicia-se espontaneamente (Chou *et al.*, 2011; Burbank *et al.*, 2013) pela equação (1.6).



O carbonato de cálcio pode apresentar três formas de cristais, denominadas calcite, aragonite e vaterite (Al-Thawadi, 2011). Técnicas microscópicas mostram que a estrutura da calcite varia com a formulação do tratamento (Al Qabany *et al.*, 2013).

A precipitação de carbonato de cálcio por hidrólise de ureia é um processo químico bastante simples governado essencialmente por 4 factores: a concentração de cálcio; a concentração de carbono inorgânico dissolvido; o pH do meio e a disponibilidade de locais de nucleação (Hammes *et al.*, 2002).

Existem vários estudos deste método com destino a aplicação prática em engenharia, entre as quais se destacam a proteção e restauração de monumentos de calcário (Tiano *et al.*, 1999), a remoção de contaminantes de águas freáticas (Fujita *et al.*, 2000), a produção de argamassas

biológicas sobre cimentos (De Muynck *et al.*, 2008), ou o preenchimento de poros em reservatórios rochosos destinados a armazenamento de petróleo (Nemati *et al.*, 2003).

A par destes estudos surge também o interesse em introduzir a biotecnologia na estabilização de solos, com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas destes. Em suma, a bioestabilização é uma técnica de estabilização química e biológica, em que o agente ureolítico catalisa a hidrólise da ureia, e que, na presença de íons de cálcio, forma calcite *in-situ*. Em condições adequadas, este produto formado pode resultar na solidificação do solo, com um interesse comercial significativo (Whiffin, 2004).

2.2 Bioestabilização de solos

A litificação natural de sedimentos ocorre como resultado de processos físicos, químicos e biológicos. Com a deposição dos sedimentos em camadas, estes são compactados pelas camadas superiores (geologicamente mais recentes), e cimentados por minerais que precipitam nas águas subterrâneas. Geralmente, a formação de rochas sedimentares são processos lentos. A utilização da biotecnologia pode acelerar a cimentação, induzindo conversões bioquímicas, que podem resultar na precipitação de minerais inorgânicos (van Paassen, 2009).

Na bioestabilização, a hidrólise da ureia pode ser conseguida por *urease* proveniente de microrganismos (Whiffin *et al.*, 2004), ou por *urease* proveniente de plantas como a *Canavalia Ensiformis* (Yasuhara *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2013). As partículas de areia soltas cimentadas por sistemas de precipitação de CaCO₃ *in situ*, dão origem a um elevado grau de cimentação de calcite, com um resultado semelhante à sedimentação natural (Al-Thawadi, 2011). Trata-se, portanto, de um processo semelhante à formação natural de rochas (Ismail *et al.*, 2002).

A resistência do material poroso estabilizado depende da resistência das ligações entre as partículas, que está diretamente relacionada com a qualidade e quantidade da precipitação de calcite (Al-Thawadi, 2008).

2.2.1 Precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente

A precipitação do carbonato de cálcio induzida microbiologicamente, doravante MICP - denominação na literatura anglo-saxónica *Microbially Induced Calcite Precipitation* - é um processo biológico natural em que os microrganismos produzem materiais inorgânicos como parte das suas atividades metabólicas básicas (Stocks-Fischer *et al.*, 1999).

A utilização de microrganismos para controlar processos químicos é interessante devido à sua presença difundida no solo e aos milénios durante os quais estes têm sido ativos. Na superfície terrestre existem 10¹² microrganismos por quilograma de solo (Mitchell e Santamarina, 2005).

A biomineralização por precipitação de CaCO₃ pode ser obtida microbiologicamente, em que a aspersão e alimentação de bactérias, desenvolvidas em suspensão dentro de um meio de cultura apropriado, sobre um material poroso, promove a precipitação de CaCO₃ in-situ (Lee, 2003). O papel dos microrganismos na precipitação de carbonato de cálcio é atribuído à produção de carbonato, criação de um meio alcalino e ainda atuar como um local de nucleação numa solução sobressaturada (van Paassen, 2009). Para tal, esses microrganismos têm de ter capacidade de produzir elevada atividade da enzima *urease* (Stocks-Fisher *et al.*, 1999), e com alta tolerância à presença de ureia, cálcio, e dos subprodutos da reação química de precipitação de CaCO₃ (Whiffin, 2004).

A MICP promove ligações de cimentação das partículas de solos não coesivos, permitindo o contacto entre estas, modificando a resistência mecânica do material (van Paassen *et al.*, 2010a; DeJong *et al.*, 2006). A cimentação ocorre preferencialmente no contacto entre as partículas do solo e a sua rotura durante o corte ocorre nos cristais de calcite (DeJong *et al.*, 2013).

A bactéria *Sporosarcina pasteurii* tem a capacidade de gerar alta quantidade de *urease*, sendo um estirpe com alta tolerância aos produtos químicos envolvidos na cimentação (Ca²⁺, ureia, NH₃ / NH₄⁺, e Cl⁻) (Al-Thawadi, 2008).

Na Holanda, na Universidade de Delft, Whiffin *et al.* (2007) estudou uma coluna vertical de areia de Itterbeck com 5 metros de altura e 66 mm de diâmetro, submetida a bioestabilização por intermédio da bactéria *Sporosarcina pasteurii*. Por percolação descendente (0,35 L/h), foram injetados 6,34 litros de solução de bactérias, seguidos de 5,99 litros de solução com 0,05 mol/L de CaCl₂ e por fim 8,715 litros de ureia-CaCl₂ com concentração equimolar de 1,1 mol/L.

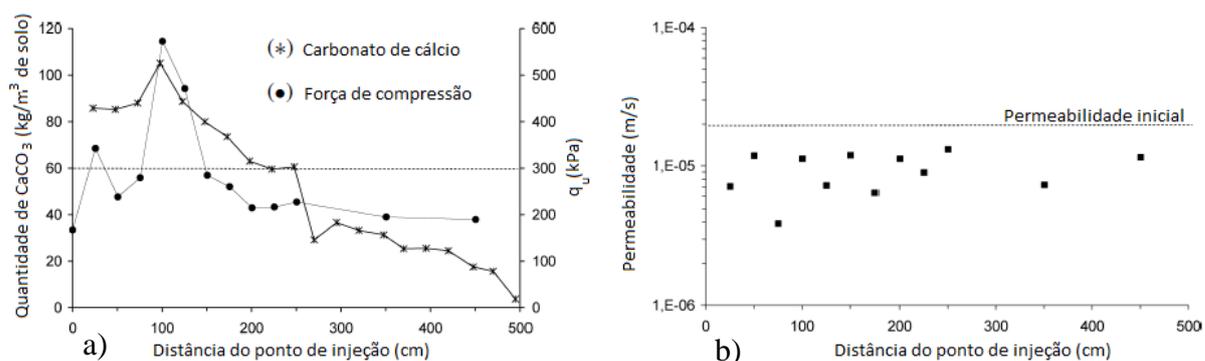


Figura 2.2 – MICP em coluna de areia com 5 metros de altura: a) quantidade de precipitado e força de compressão ao longo da altura da coluna; b) variação da permeabilidade ao longo da altura da coluna. (Whiffin *et al.*, 2007)

Na Figura 2.2 (a) apresentam-se os resultados de ensaios triaxiais drenados com pressão de confinamento de 50 kPa. A máxima resistência observa-se a um metro do ponto de injeção, com 570 kPa, coincidindo com a maior quantidade de CaCO₃ precipitado (105 kg/m³ solo). Observa-se também que o aumento de resistência não é uniforme ao longo da coluna.

Na Figura 2.2 (b) denota-se a influência da bioestabilização na redução da permeabilidade do solo, relativamente à permeabilidade inicial. A MICP promove assim a redução do volume de vazios, causada pela precipitação de carbonato de cálcio. No ponto com maior quantidade de CaCO_3 precipitado, a porosidade é reduzida em 90% relativamente ao material não tratado.

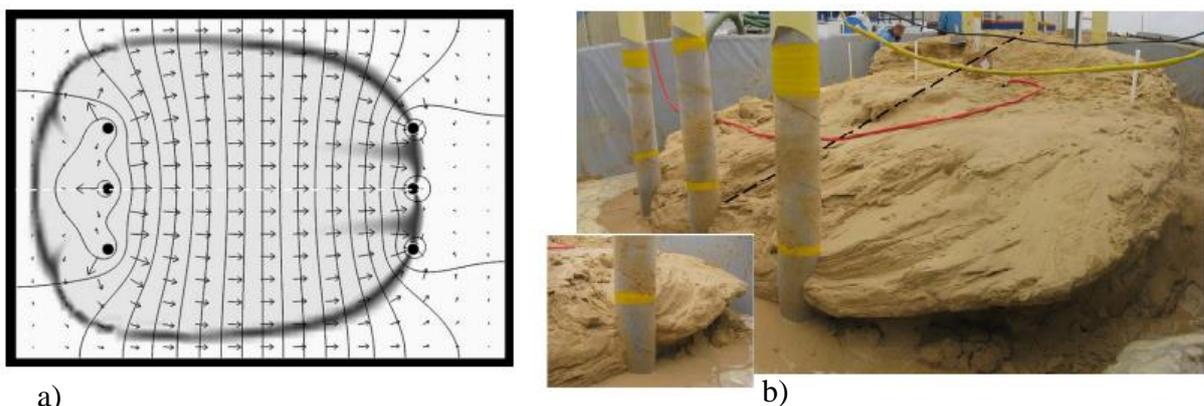


Figura 2.3 – Ensaio de campo de bioestabilização: a) vista superior com fluxo de injeções; b) volume de solo no final do melhoramento (van Paassen *et al.*, 2010a).

Também na Universidade de Delft foi realizado, por van Paassen *et al.* (2010a), um estudo da técnica MICP numa escala superior, simulando as condições de campo. O solo arenoso de Itterbeck, com um volume de 100 m^3 ($8,0\text{m} \times 5,6\text{m} \times 2,5\text{m}$) foi estabilizado através de três poços de injeção combinados com três poços de ejeção, como se podem observar na Figura 2.3 a).

Numa primeira fase foram injetados 5 m^3 de solução de bactérias seguidos de 5 m^3 de $0,05 \text{ mol/L}$ de CaCl_2 . Posteriormente, 96 m^3 de ureia- CaCl_2 , com uma concentração de 1 mol/L , foram injetados num período de 16 dias. No final deste tempo, 30 m^3 de água da rede pública foram percolados de maneira a retirar os subprodutos da reação.

Após 16 dias de bioestabilização, o solo foi descofrado, Figura 2.3 b), sendo retirado o material não bioestabilizado. Observou-se que aproximadamente 40 m^3 de volume de solo (40% do volume total) tornou-se biocalcificado.

O material foi sujeito a inúmeros ensaios UCS, onde a resistência à compressão não confinada, entre $0,7$ e $12,4 \text{ MPa}$, demonstrou resultados amplos, embora com elevada variância (valores representados graficamente na Figura 2.14). A quantidade de CaCO_3 quantificada após os ensaios UCS varia entre $12,6$ e $27,3\%$, relativamente ao peso seco do solo.

O valor médio de CaCO_3 estimado no volume total de solo bioestabilizado é de $6,8\%$, o que, com base neste valor, a quantidade de CaCO_3 precipitado é de $4,50 \text{ kg}$ (correspondendo aproximadamente a 50% de uma taxa de precipitação, comparativamente à massa teórica máxima derivada das quantidades de reagentes injetados).

A distribuição homogénea das bactérias e dos reagentes no solo, com consequência direta na distribuição de CaCO_3 e nas propriedades geotécnicas do material, é um desafio fundamental da técnica para futuras otimizações (van Paassen *et al.*, 2010a).

MICP no Departamento de Engenharia Civil da Universidade de Coimbra

Costa (2012) e Venda Oliveira *et al.* (2015) compararam a eficiência de duas bactérias (*Sporosarcina pasteurii* e *Idiomarina insulissalae*) no processo de bioestabilização de um solo arenoso, o qual coincide com o solo do presente estudo.

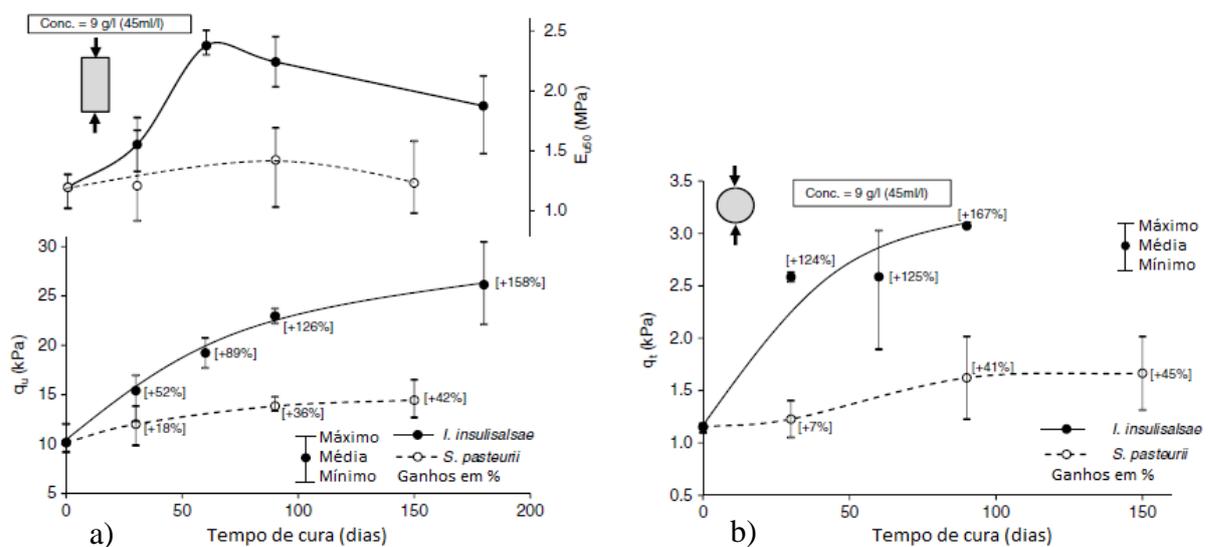


Figura 2.4 – Efeito do tempo de cura na eficiência das bactérias *I. insulissalae* ou *S. pasteurii*: (a) evolução de q_u e E_{u50} ; (b) evolução de q_t (Venda Oliveira *et al.*, 2015).

Como se observa na Figura 2.4, existe um aumento de resistência mecânica à compressão (a) e à tração (b) no tempo. A melhoria em ambos os casos é mais notória para a bactéria *I. insulissalae*, induzindo o aumento de resistência no tempo. O valor de força de compressão não confinada regista um aumento médio de +158% ao fim de 180 dias, relativamente ao solo não estabilizado.

Na Figura 2.5 pode observar-se que o aumento da concentração em bactérias *I. insulissalae* promove, na generalidade dos casos, uma melhoria nas propriedades mecânicas do solo, melhorando a eficiência com o aumento do tempo de cura. Estes ganhos de resistência mecânica podem potencialmente resolver problemas geotécnicos, como a liquefação ou a erosão, onde não é necessária uma notável resistência do solo (Venda *et al.*, 2015).

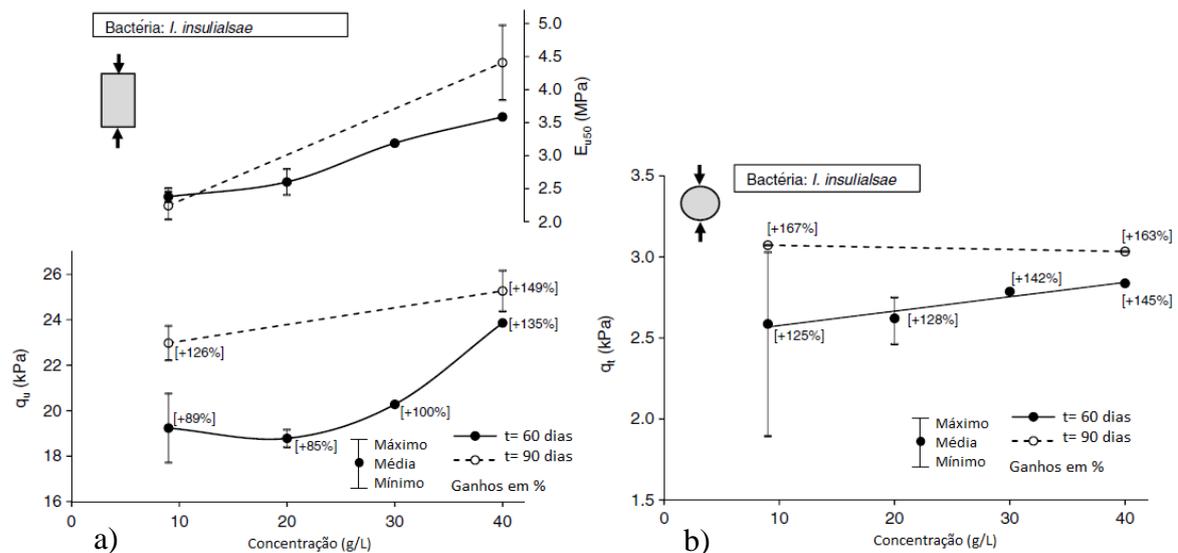


Figura 2.5 – Efeito da concentração de bactérias *I. insulialsae* : (a) evolução de q_u e E_{u50} ; (b) evolução de q_t . (Venda Oliveira *et al.*, 2015).

Obstáculos e desafios da MICP

A aplicação de MICP na estabilização de solos não coesivos em ensaios laboratoriais e escassos ensaios de campo revela algumas dificuldades práticas na sua aplicação:

- A variabilidade da atividade de *urease* em microrganismos e o seu controlo numa larga escala é um assunto pouco clarificado, que representa o risco de produção de uma reduzida atividade, insuficiente para promover a hidrólise da ureia (Whiffin, 2004).
- A produção de amónia (NH_4^+) aquando da hidrólise da ureia, onde se geram 2 moles de amónia por cada mole de ureia, pode formar cloreto ou nitrato de amónia. Concentrações elevadas de amónia são tóxicas para a maior parte dos organismos (Whiffin, 2004; van Paassen *et al.*, 2010a), sendo que estes subprodutos devem ser tratados. O processo de nitrificação/desnitrificação (requerendo a adição de uma fonte de carbono) pode contribuir para atenuar o problema (Whiffin, 2004).
- A formação de precipitado, e conseqüente ligação entre as partículas, promove uma redução de permeabilidade que dificulta um tratamento homogéneo na área de intervenção (Harkes *et al.*, 2010).
- O transporte de bactérias, e conseqüentemente a sua atividade, é limitado em solos finos (van Paassen, 2009). As bactérias têm um tamanho de 0,5 a 5 μm , não podendo ser transportados para solos siltosos ou argilosos (Mitchell & Santamarina, 2005).
- Aumentar a escala da bioestabilização do laboratório para o campo é um dos maiores desafios na vertente geotécnica do método (DeJong *et al.*, 2013; van Paassen *et al.*, 2010a).

2.2.2 Precipitação de carbonato de cálcio via enzimática

Quando se refere precipitação de CaCO₃ por via enzimática, está-se a especificar que a enzima *urease* é adicionada sobre a forma cristalizada, proveniente de *Canavalia Ensiformis*. Na bibliografia anglo-saxónica este método denomina-se EMCP – *Enzyme Mediated Calcite Precipitation* (Neupane *et al.*, 2015).

Como se abordou no subcapítulo anterior, na técnica MICP os microrganismos geram a enzima *urease*, que catalisa a hidrólise da ureia, requerida na precipitação de carbonato de cálcio. Essa catálise pode ser também alcançada através da adição direta da enzima *urease* derivada de plantas, não sendo necessário considerar o processo microbiológico, contornando assim as complexidades de cultivo e armazenamento das bactérias (Hamdan *et al.*, 2013).

O EMCP constitui um método mais simples de precipitar o carbonato de cálcio, em comparação com os métodos bacterianos, como forma de alcançar uma melhoria uniforme das propriedades mecânicas do solo (Yasuhara *et al.*, 2012), que é um desafio essencial desta técnica (Neupane *et al.*, 2015).

O tamanho reduzido da enzima *urease*, na ordem de 12 nm (Blakely e Zerner, 1984), sugere que a aplicação desta técnica pode estender-se a solos finos, ao invés do MICP (Hamdan *et al.*, 2013).

É de reparar que a produção de amónio (NH₄⁺) aquando da hidrólise da ureia apontada como obstáculo do MICP, constitui também um problema nesta técnica.

A presença de *urease* no solo, geralmente derivada de microrganismos mortos ou em decomposição, e, possivelmente, derivada de plantas, pode persistir no meio por longos períodos de tempo, sem degradação ou perda de função (Pettit *et al.*, 1976), podendo, essa atividade, ser utilizada em aplicações subsequentes (Whiffin, 2004). Em contrapartida, quando a *urease* é adicionada exogenamente a um meio poroso tem um tempo de atuação limitado ocorrendo a diminuição da sua atividade no tempo (Marzadori *et al.*, 1998; Pettit *et al.*, 1976). Este tempo de atuação limitado pode ser vantajoso na medida em que evita impactes de longo prazo no ecossistema (Hamdan *et al.*, 2013).

Precipitação de CaCO₃ via enzimática em meio não poroso

Nemati *et al.* (2003) estudou o efeito da concentração de *urease* e da temperatura na precipitação de CaCO₃ (Figura 2.6). A *urease* utilizada tinha uma atividade de 26100 U/g, sendo as soluções compostas por 12g/L ureia e 30 g/L de cloreto de cálcio di-hidratado, num meio não poroso, i.e. sem solo. Observa-se que a produção de CaCO₃ aumenta com a concentração de *urease*, e que o aumento da temperatura de 20° para 50° induz um aumento significativo de precipitação de carbonato de cálcio (Nemati *et al.*, 2003).

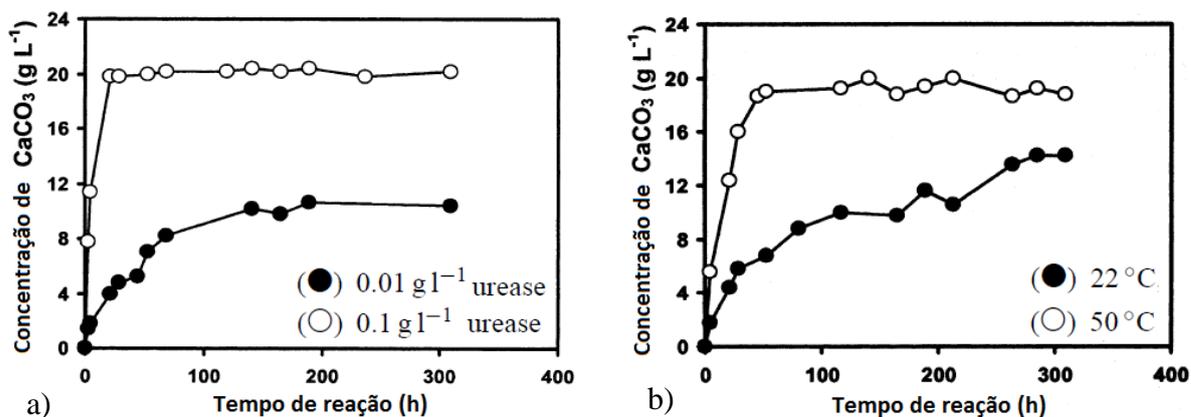


Figura 2.6 – Efeito do tempo de reação na concentração de CaCO_3 : a) efeito da concentração de *urease*; b) efeito da temperatura. (Nemati *et al.*, 2003).

Neupane *et al.* (2013) também estudou o comportamento da enzima *urease* (2950 U/g) perante duas concentrações de ureia- CaCl_2 (0,5 e 1,0 mol/L) com um tempo de reação de 24 horas, tendo-se obtido uma maior taxa de precipitação para a menor concentração de 0,5 mol/L (Figura 2.7).

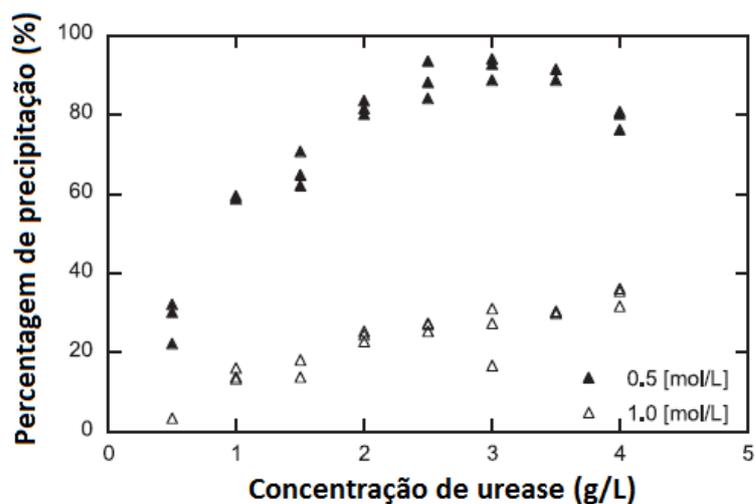


Figura 2.7 – Relação entre a concentração de *urease* e a percentagem de precipitação de CaCO_3 para concentrações de 0,5 e 1,0 mol/L de ureia- CaCl_2 (Neupane *et al.*, 2013).

Precipitação de CaCO_3 em meio poroso

No Japão surgiram avanços na técnica de bioestabilização por via enzimática, tendo Yasuhara *et al.* (2012) publicado resultados experimentais de UCS da areia de Toyoura bioestabilizada. O procedimento consistiu na mistura da enzima *urease* em pó com 300 g de solo. O provete (50mm de diâmetro e 100mm de altura com o solo com densidade relativa de 50%) foi colocado numa célula triaxial com uma pressão de confinamento de 50 kPa. Posteriormente, foram

injetados, durante meia hora, 100mL de solução equimolar de ureia- CaCl_2 , 4 ou 8 vezes em intervalos de 2 horas.

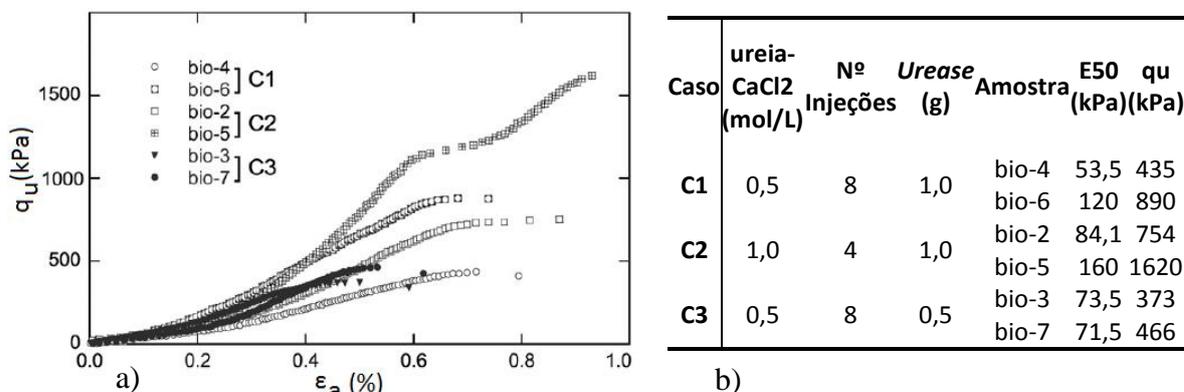


Figura 2.8 - Areia de Toyoura bioestabilizada: a) curvas de tensão-extensão UCS; b) quantidade de reagentes, q_u e Eu_{50} de cada amostra (Yasuhara *et al.*, 2012).

Os 3 casos apresentados na Figura 2.8 mostram uma resistência à compressão uniaxial entre 400 e 1600 kPa, estando 5 a 10% do volume dos poros ocupado por carbonato de cálcio precipitado (Yasuhara *et al.*, 2012). Repare-se que injetar 8 vezes a solução de ureia- CaCl_2 corresponde a aproximadamente 4 vezes o volume do provete vazio.

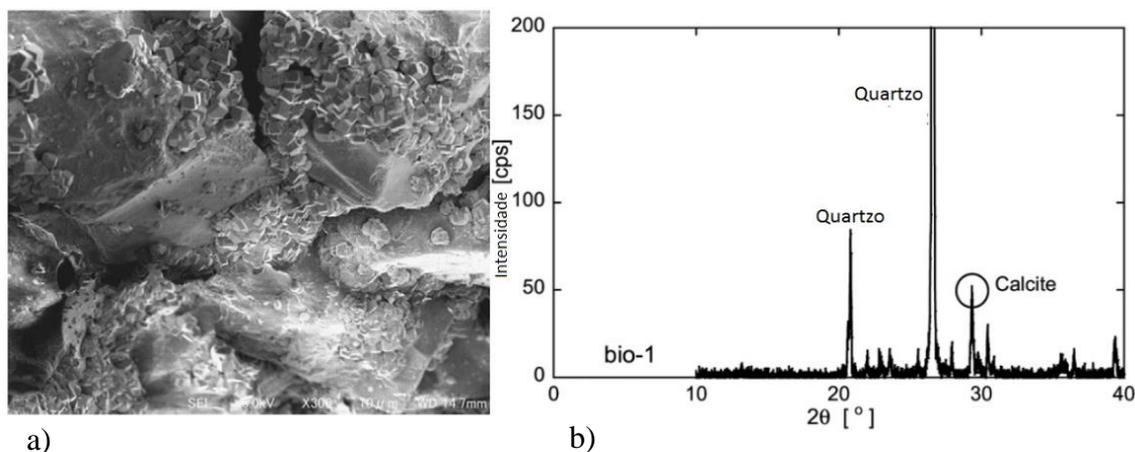


Figura 2.9 – Amostra de solo bioestabilizado por via enzimática: a) ensaio SEM; b) ensaio XRD (Yasuhara *et al.*, 2012).

De maneira a corroborar a presença de CaCO_3 , Yasuhara *et al.* (2012) submeteu uma amostra (do caso C1) a ensaios SEM (microscópio eletrónico de varrimento) e XRD (difração de raios X). É visível na Figura 2.9 que as partículas de solo ficam envolvidas por precipitado de CaCO_3 , criando ligação entre estas. No ensaio XRD observa-se a presença de quartzo, do solo arenoso, e de calcite proveniente da bioestabilização.

Yasuhara *et al.* (2012) constatou uma redução da permeabilidade, devido ao preenchimento dos vazios do solo com CaCO_3 , em mais de uma ordem de magnitude, a qual é inversamente proporcional à quantidade de precipitado formado (Figura 2.10).

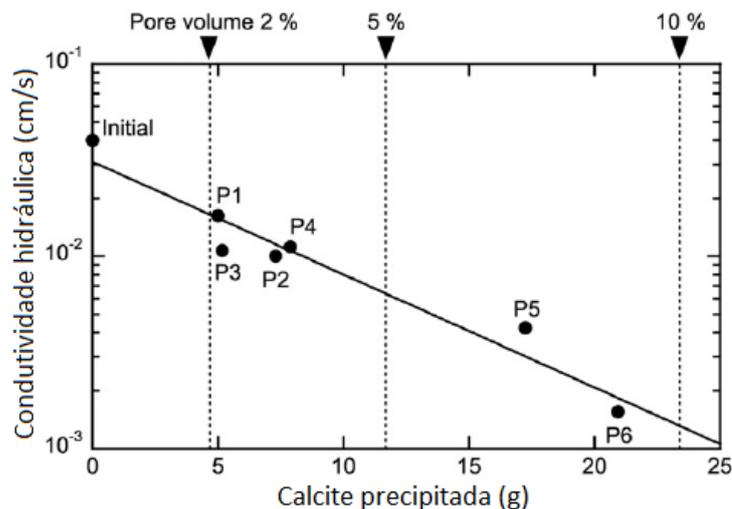


Figura 2.10 – Condutividade hidráulica vs quantidade de CaCO_3 (Yasuhara *et al.*, 2012)

No seguimento do trabalho anterior, Neupane *et al.* (2013) sugere uma alteração no procedimento de ensaio, em que se evita a mistura prévia da enzima *urease* com o solo que se pretende estabilizar. Assim sugere que a enzima seja injetada através de uma solução aquosa com o mesmo volume da solução de ureia- CaCl_2 e em simultâneo com esta última.

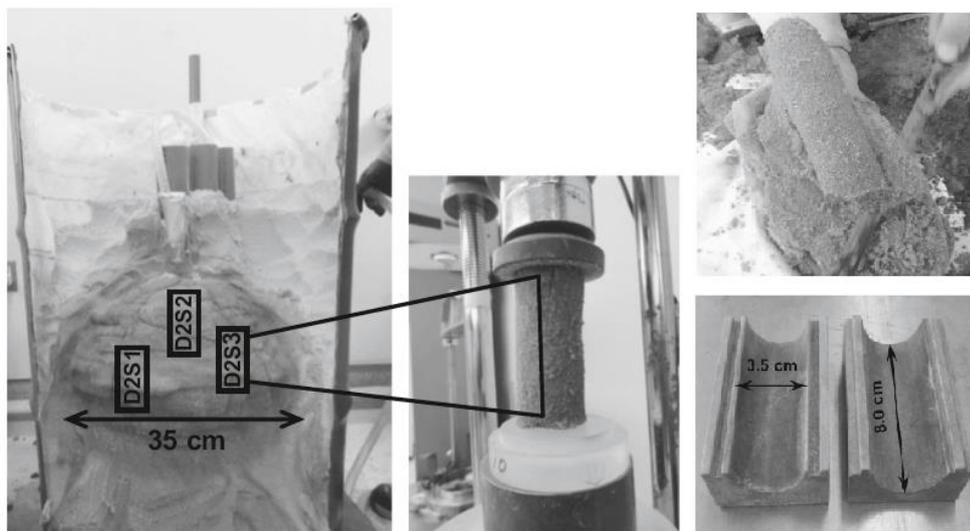


Figura 2.11 – Bioestabilização de areia de sílica: material bioestabilizado no provete metálico e preparação de provetes cilíndricos para ensaios UCS. (Neupane *et al.*, 2015).

No trabalho desenvolvido por Neupane *et al.* (2015), um tubo de aço (57 cm de diâmetro e 85cm de altura) é preenchido com areia de sílica, com uma densidade de 50%, onde são

injetadas as duas soluções, atrás referidas, em conjunto (Figura 2.11). A solução injetada corresponde a 30 litros com uma concentração de ureia- CaCl_2 de 1 mol/L e 15 g/L de *urease* (isto é, 44550 U/L de *urease*). Esta solução, é injetada, com uma velocidade de 1,0 L/min, por duas vezes com um intervalo de 2 horas, perfazendo 60 litros (aproximadamente 28% do volume do provete metálico vazio).

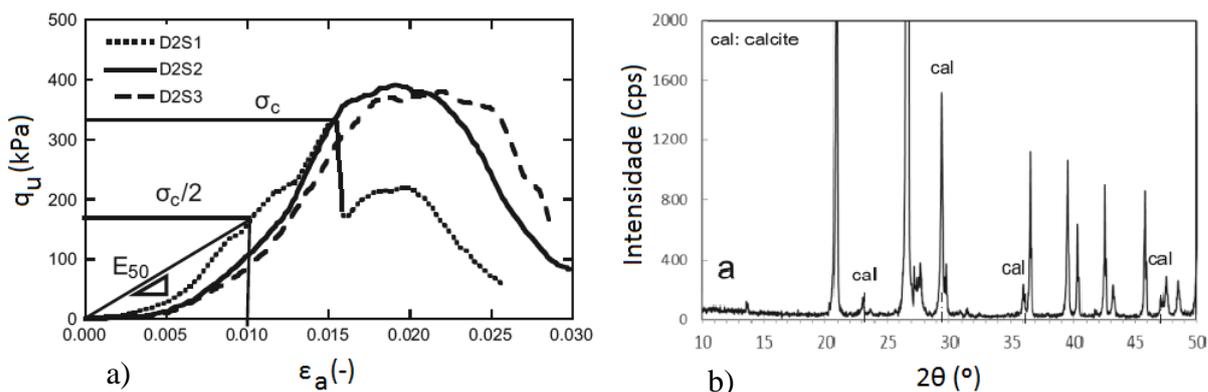


Figura 2.12 – Bioestabilização de areia de sílica: a) curvas de tensão-extensão UCS; b) Resultado de ensaio XRD no material melhorado (Neupane *et al.*, 2015).

Após 24 horas da segunda injeção, o solo não estabilizado é retirado do tubo metálico, permanecendo apenas o material estabilizado, tendo submetido três amostra a ensaios UCS (Figura 2.11). O material biocimentado foi ainda sujeito a ensaios de difração de raio X (Figura 2.12 b)), onde se corroborou a presença de CaCO_3 .

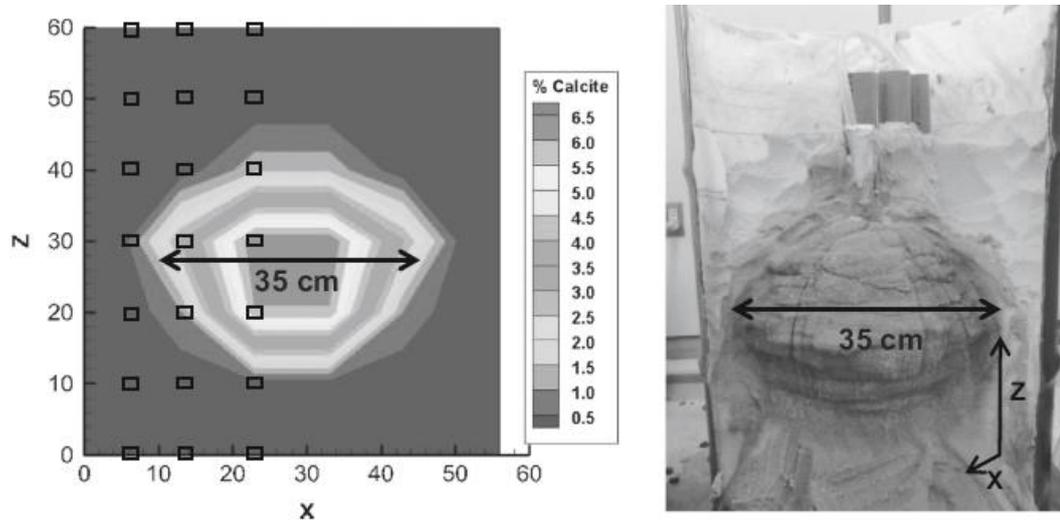


Figura 2.13 – Bioestabilização de areia de sílica: Distribuição da percentagem de calcite num plano que passa no centro do tubo metálico (Neupane *et al.*, 2015).

Na figura 2.12 a), os resultados de ensaios de compressão simples não confinada mostram que a precipitação de CaCO_3 é capaz de introduzir modificações perceptíveis nas propriedades mecânicas do solo, e que a sua distribuição aparenta ser uniforme em todas as direções (Figura 2.13) embora o alcance a uma maior área de tratamento, tal como na técnica microbiológica, seja ainda um desafio fundamental da bioestabilização (Neupane *et al.*, 2015).

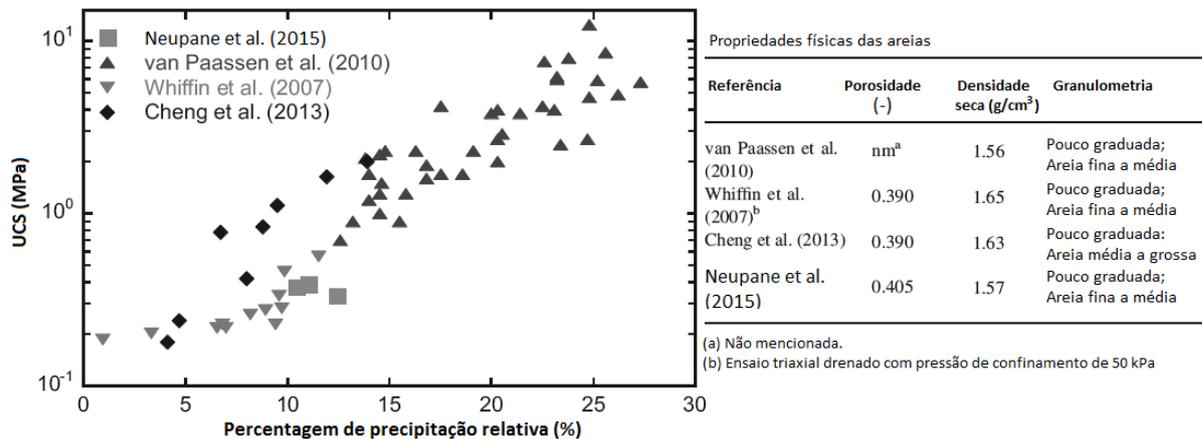


Figura 2.14 – Comparação entre MICP e EMCP (Neupane *et al.*, 2015)

Na Figura 2.13 estão representados 4 estudos de bioestabilização, dos quais Whiffin *et al.* (2007), van Paassen *et al.* (2010a) e Cheng *et al.* (2013) são com o processo MICP e Neupane *et al.* (2015) com processo EMCP.

Observa-se que na generalidade dos casos o aumento da resistência mecânica é diretamente proporcional à percentagem de precipitação relativa ao peso seco do solo, i.e. à quantidade de CaCO_3 presente na amostra.

3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

O presente capítulo pretende caracterizar o solo em estudo, extraído na periferia da cidade de Leiria (Figura 3.1), bem como a identificação dos materiais envolvidos na sua estabilização através da precipitação induzida de carbonato de cálcio.



Figura 3.1 – Local de extração do solo em estudo (Costa, 2012).

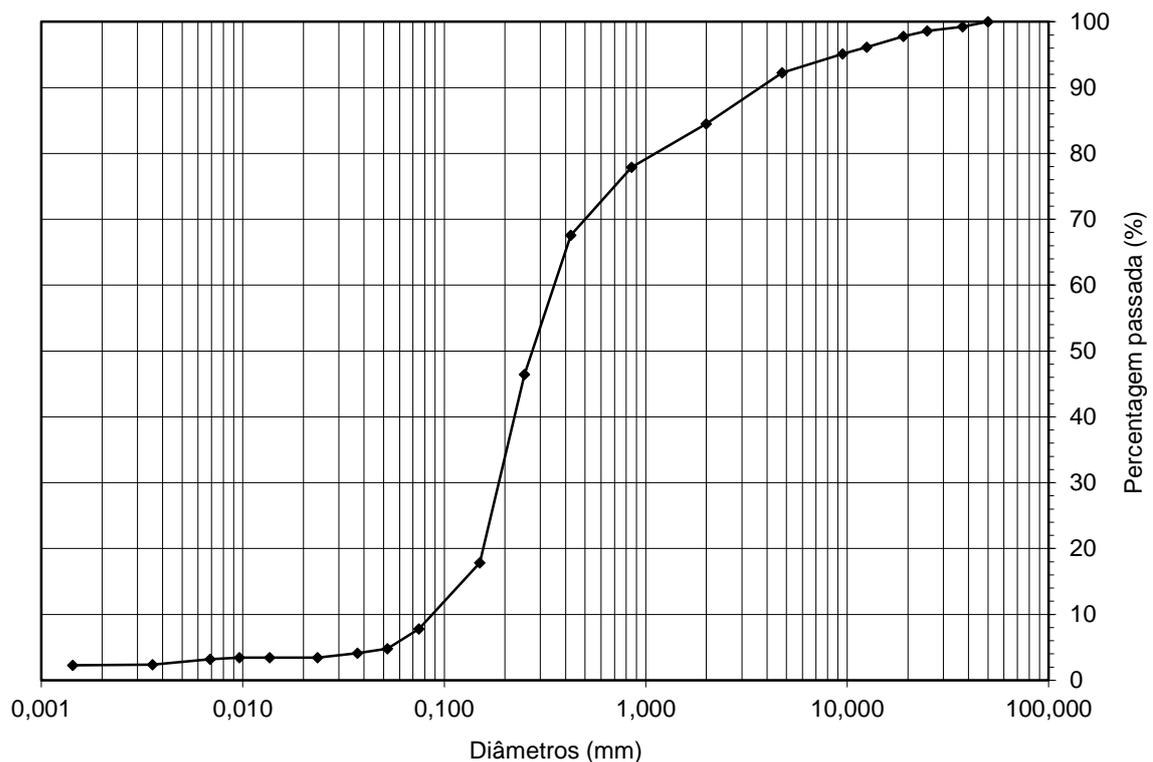
3.1 Caracterização geotécnica do solo

Nesta secção, as características de identificação analisadas são a composição granulométrica, a densidade das partículas sólidas, os limites de consistência, o ensaio de compactação, o teor em matéria orgânica e o pH do solo.

3.1.1 Composição granulométrica

A distribuição granulométrica das partículas de solo de acordo com as suas dimensões foi laboratorialmente avaliada sobre uma pequena toma de uma amostra remexida de grande volume.

Conforme os procedimentos de ensaio descritos na especificação E196 (1966), do LNEC, as partículas de dimensões superiores ao peneiro de malha 0,075mm são avaliadas pelo método de peneiração e as partículas de dimensões inferiores a esse valor, por sedimentação. A distribuição em percentagem ponderal das partículas do solo de acordo com as suas dimensões está representada graficamente na Figura 3.2.



Argila	Silte	Areia	Cascalho
--------	-------	-------	----------

Figura 3.2 – Curva granulométrica para o solo em estudo.

A classificação das partículas do solo de acordo com as suas dimensões indica que a massa de solo avaliada engloba 2,3% de argila, 3,5% de silte, 78,7% de areia e 15,5% de cascalho. Como o diâmetro nominal das partículas de maiores dimensões é de 37,5 mm não se verifica a existência de calhaus ou pedras.

De maneira a classificar o solo recorreu-se à norma ASTM D 2487 (1998). Como o coeficiente de uniformidade, $C_U = 4$, é inferior a 6 a areia é mal graduada, pertencendo ao grupo SP. Por ter finos no intervalo de 5 a 12%, acrescenta-se areia mal graduada com silte (SP-SM). Como a amostra contém mais de 15% em cascalho, junta-se na designação “com cascalho”.

Em conclusão, a Classificação Unificada remete para uma areia mal graduada com silte e com cascalho, designação de Areia SP-SM com cascalho.

3.1.2 Densidade das partículas sólidas

A determinação da densidade das partículas sólidas (G_s) foi efetuada de acordo com a norma NP-83 (1965). Não foi determinada a densidade das partículas sólidas para as partículas com dimensões superiores a 4,76 mm visto estas corresponderem apenas a 7.75% (como se pode observar na Figura 3.2) e pelo facto de, no seguimento do trabalho laboratorial, não se utilizar a dita fração de solo.

A partir do resultado de três amostras definiu-se um valor médio de $G_s = 2,71$, com um desvio padrão de 0,01. Costa (2012) obteve um valor de $G_s=2.63$, que corresponde a 97% do valor obtido neste estudo. Ambos os valores estão no intervalo comum de 2.6-2.8 (Matos Fernandes, 2012).

3.1.3 Limites de consistência

Pela norma NP 143 (1969), verifica-se que a determinação dos limites de liquidez, de plasticidade e de retração não é aplicável ao solo em estudo, visto a fração de partículas de dimensões inferiores a 0,05 mm é de 4,7%, muito inferior a 30%. Repare-se que, sendo este um solo predominantemente arenoso a determinação destes limites, mesmo quando possível, perde o seu significado.

3.1.4 Ensaio de compactação

Com o intuito de determinar a relação entre o teor de humidade e o peso volúmico seco do solo recorreu-se à especificação E197 (1966), LNEC.

O tipo de compactação adotado é compactação leve em molde pequeno. O pilão de compactação tem 2,49 kg de massa, 305 mm de altura de queda e base de compactação de 50 mm de diâmetro. O molde cilíndrico pequeno é de aço com 102 mm de diâmetro interior e 117 mm de altura, munido de alonga e base. Este tipo de compactação pretende simular um compactador de pequenas dimensões, tal como os utilizados na execução de caminhos pedonais.

Com a realização de 8 provetes e conseqüente medição do peso volúmico e do teor de humidade obtiveram-se 5 pontos numa tendência ascendente e 3 pontos numa tendência descendente. A ordenada máxima da curva indica a peso volúmico seco máximo, onde a correspondente abcissa permite obter o teor ótimo em água. Assim, para um teor de 12% obtém-se uma compactação mais eficaz, onde o solo atinge um peso volúmico seco de $17,3 \text{ kN/m}^3$. Costa, 2012, obteve um valor de teor ótimo em água de 11,7% e um peso volúmico seco máximo de $18,8 \text{ kNm}^{-3}$.

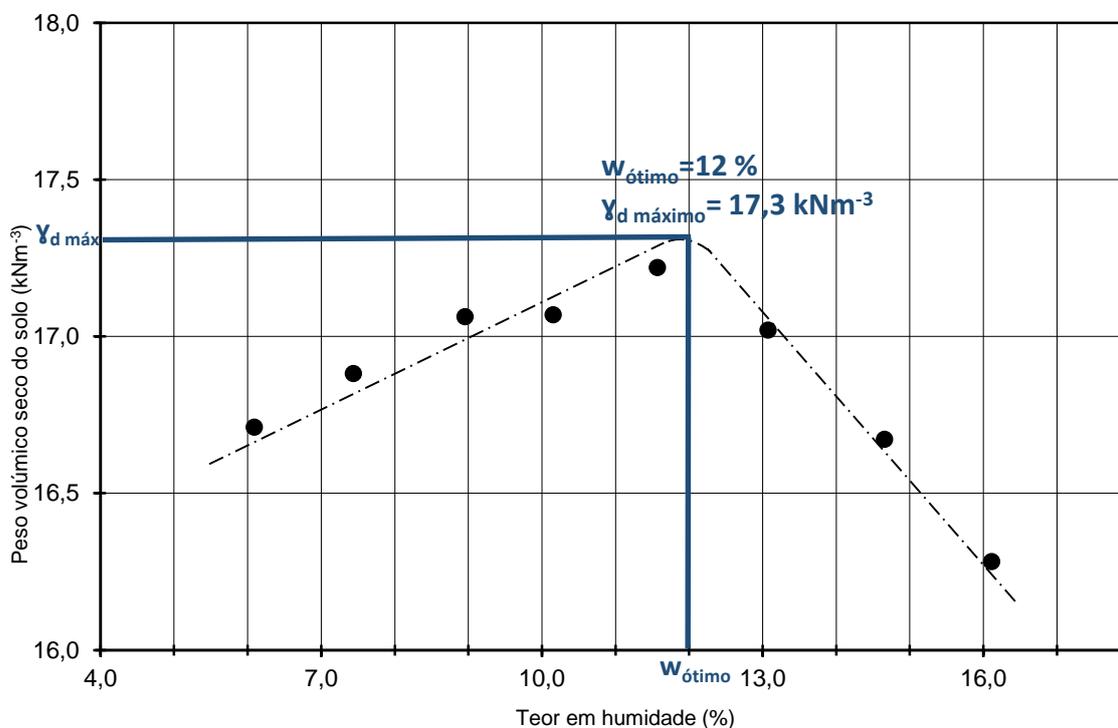


Figura 3.3 – Representação gráfica do ensaio Proctor. Destaque do teor em humidade ótimo e respetivo peso volúmico seco do solo máximo.

3.1.5 Teor em matéria orgânica

O teor em matéria orgânica foi realizado pelo método por ignição aplicado ao intervalo de temperaturas 50°-400° (Correia, 2011). O cálculo foi conduzido por uso da equação 3.1, baseada na norma BS 1377-3 (1990).

$$OM = (P_s^{50^{\circ}C} - P_s^{400^{\circ}C}) / (P_s^{50^{\circ}C} - P_{cápsula}) \quad (3.1)$$

O valor médio das 4 amostras ensaiadas foi de 0,34%, variando de 0,33 a 0,36%. Valor semelhante ao obtido por Costa (2012), de 0,33%.

3.1.6 Medição do pH

Para a medição do pH do solo em estudo recorreu-se à norma BS 1377-3 (1990). Os procedimentos da referida norma foram executados em laboratório, numa sala com uma temperatura de 20±2°C e humidade relativa de 60±15%. O aparelho usado na medição de pH tem uma precisão mínima de 0,01. No caso do solo em estudo, no seu estado natural, obteve-se

um valor de pH de 8,4, tratando-se portanto de um solo alcalino. Este valor é ligeiramente inferior a Costa (2012) que obteve um valor de 8,8.

3.2 Produtos envolvidos na precipitação de CaCO_3

Os produtos envolvidos na precipitação de CaCO_3 adicionados ao solo no processo de bioestabilização desempenham um papel primordial, uma vez que desencadeiam interações de natureza física, química e biológica com as partículas de solo, conduzindo à alteração do comportamento mecânico do material daí resultante.

3.2.1 Água

Em toda a componente laboratorial realizada neste trabalho foi utilizada água destilada, obtida por um sistema de destilação a partir de água da rede pública do DEC, o que é usual nos ensaios laboratoriais, de maneira a aproximar as condições de uma água pura, com pH próximo de 7.

3.2.2 Ureia

A ureia é utilizada na precipitação de carbonato de cálcio como fonte de carbonato (CO_3^{2-}). A fórmula molecular da ureia é $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$. Neste trabalho, a ureia, proveniente da companhia *Acros Organics*, é utilizada sobre a forma de cristais, com uma pureza de 99,5%. O produto tem uma massa molar de 60,06 g/mol.

3.2.3 Cloreto de cálcio

O cloreto de cálcio, CaCl_2 , é usado como fonte de cálcio na precipitação de carbonato de cálcio. O produto, oriundo da companhia *Applichem Panreac*, tem uma pureza de 95% e uma massa molar 110,99 g/mol.

3.2.4 Enzima *urease*

A enzima *urease* utilizada neste estudo é proveniente de *Canavalia Ensiformis*, comercializados em lotes pela companhia alemã Sigma-Aldrich. A enzima *urease* é o produto biológico que catalisa a hidrólise da ureia (equação 1.1).

De acordo com as informações do produto, o valor ótimo de pH é 7,4 e a temperatura ótima é de 60°C. O lote deve ser armazenado num intervalo de temperatura de 2-8°C, equivalente à temperatura de um frigorífico.

A referência dos lotes utilizados é U1500, sendo que a atividade varia de acordo com o número do lote (15 a 50 kU/g). A atividade da enzima é expressa em Unidades, que se define por: uma unidade liberta 1,0 μmol de NH₃ da ureia por minuto, a 25 °C e com um pH de 7,0.

As instruções de preparação remetem para a colocação da enzima com uma concentração de 10 mg/mL numa solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, originando uma aparência de solução com uma possível neblina.

Neste trabalho são usados 3 lotes distintos de enzima *urease*. Para o estudo da precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio, descrito em 4.2, foi utilizado um lote de enzima 088H7000, extraído no ano de 1998, cedido pela Faculdade de Farmácia da UC. Esse lote continha 20 kU, sendo que a atividade era de 16000 U/g. Para o estudo da precipitação no solo foram utilizados 2 lotes do mesmo ano de extração (2012) sendo a referência SLBB0100V. Estes continham 20 kU mas a atividade era de 34310 U/g, superior ao lote referido anteriormente.

3.2.5 Solução tampão de fosfato de sódio

A solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M é utilizada para a preparação da solução de enzima *urease*, conforme as instruções de preparação do fabricante, nos provetes submetidos a cura em câmara húmida (descrito no item 4.3.2). Esta solução tampão permite manter o pH constante dentro da faixa ideal, próximo de 7, quando se prepara a enzima. A solução foi cedida pelo Departamento de Ciências da Vida da FCTUC.

4 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

4.1 Introdução

O presente capítulo visa a descrição dos trabalhos laboratoriais, bem como a apresentação do plano de ensaios desenvolvidos no presente trabalho.

Inicia-se com a apresentação do procedimento de ensaio para a aferição do comportamento da solução estabilizadora em tubos de ensaio. Posteriormente, descreve-se o procedimento de compactação do solo e da técnica de bioestabilização. Em seguida, alude-se a metodologia dos ensaios UCS.

Por fim detalha-se o plano de ensaios que constitui a parte laboratorial do presente trabalho.

4.2 Precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio

De maneira a aferir o comportamento da solução aquosa estabilizadora, composta pela enzima *urease*, ureia e CaCl₂, perante as concentrações dos seus componentes e do tempo de reação, são inicialmente realizados ensaios laboratoriais em tubos de ensaio de vidro.

Para caracterizar o CaCO₃ precipitado, proveniente desses ensaios, são realizados testes de difração de raio X, no IPN.

4.2.1 Aparelhos e utensílios

Para a preparação laboratorial dos tubos de ensaio utilizam-se os materiais/utensílios a seguir descritos:

- Provetas graduadas;
- Varetas de vidro;
- Vidros de relógio;
- Funil de vidro;
- Gobelés;
- Pipetas volumétricas;
- Garrafa de esguicho;
- Balança (limite erro ± 0.01 g);
- Cápsulas;
- Estufa (temperatura $105^{\circ} \pm 5^{\circ}$);
- Exsicador;
- Sacos plásticos;
- Tubos de ensaio (20 mL);
- Papel de filtro;
- Estante para tubos de ensaio;
- Luvas.

4.2.2 Procedimento de ensaio

O procedimento de ensaio para a quantificação em peso do precipitado CaCO_3 em tubos de ensaio é baseado em Neupane *et al.* (2013). O esquema do procedimento de ensaio está representado na Figura 4.1, consistindo em misturar a ureia e cloreto de cálcio em concentrações equimolares num volume de 10 mL de água destilada, mexendo até se dissolverem os reagentes e até o aspeto da solução se tornar transparente.

Para o mesmo volume é misturada a enzima *urease* e mexida durante 5 minutos, sendo posteriormente filtrada. Em seguida, pesa-se o tubo de ensaio e misturam-se as duas soluções neste, perfazendo um volume total de 20 mL. De maneira a averiguar a reprodutibilidade do precipitado, cada combinação de reagentes é repetida 3 vezes.

Imediatamente após a mistura, inicia-se a hidrólise da ureia, promovida por intermédio da enzima *urease*, e assim a ligação de iões carbonato com iões de cálcio, formando precipitado de carbonato de cálcio.

Os tubos de ensaio são colocados, em posição vertical, numa sala em ambiente (temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $60 \pm 15\%$) durante o tempo de reação definido. É colocada uma folha de papel de filtro na parte superior dos tubos de maneira a evitar entrada de impurezas que possam influenciar os resultados finais.

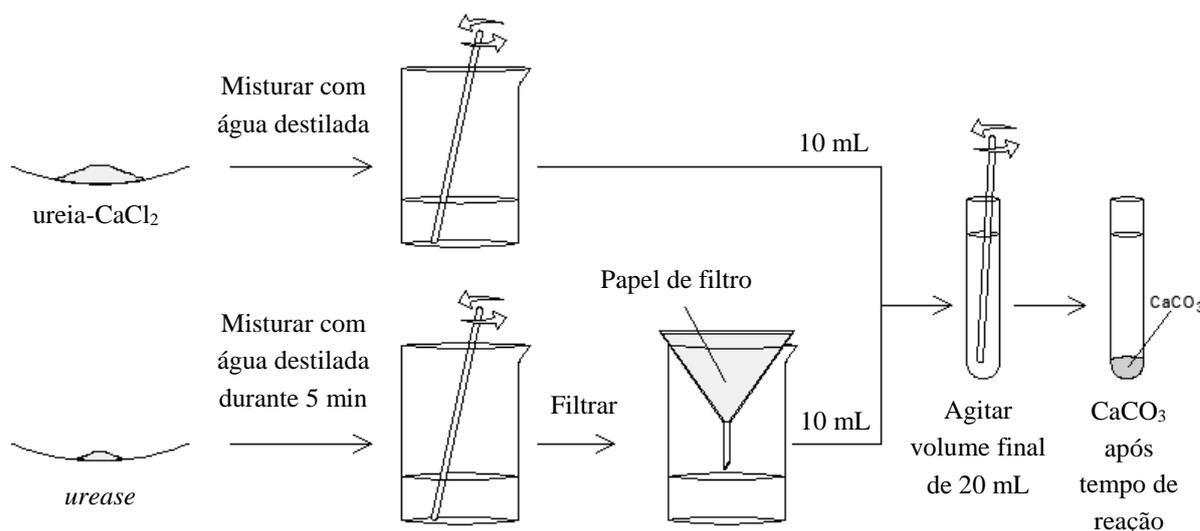


Figura 4.1 – Figura ilustrativa do procedimento de ensaio para a quantificação de CaCO_3 em tubos de ensaio, procedimento adaptado de Neupane *et al.* (2013).

Após o tempo de reação é necessário quantificar a massa de CaCO_3 formada nos tubos de ensaio (Figura 4.2). Seca-se um papel de filtro na estufa durante 20 minutos e pesa-se.

O conteúdo aquoso presente no tubo de ensaio (subprodutos da reação e o excesso de água) é extraído para um funil de vidro munido de papel de filtro. O tubo é lavado 3 vezes com água destilada (num volume de 20 mL cada lavagem), vertendo o conteúdo no mesmo funil com papel de filtro.

O tubo de ensaio com o precipitado é seco em estufa durante 5 horas e pesado. O papel de filtro é lavado com a garrafa de esguicho, seco em estufa durante 2 horas e pesado. Entre a secagem e pesagem dos materiais referidos anteriormente, estes são colocados num exsiccador durante 1 hora.

Note-se que a lavagem do tubo e do papel de filtro tem o objetivo de retirar os reagentes não precipitados, que, com a secagem em estufa, iriam precipitar por ação da temperatura, influenciando os resultados pretendidos.

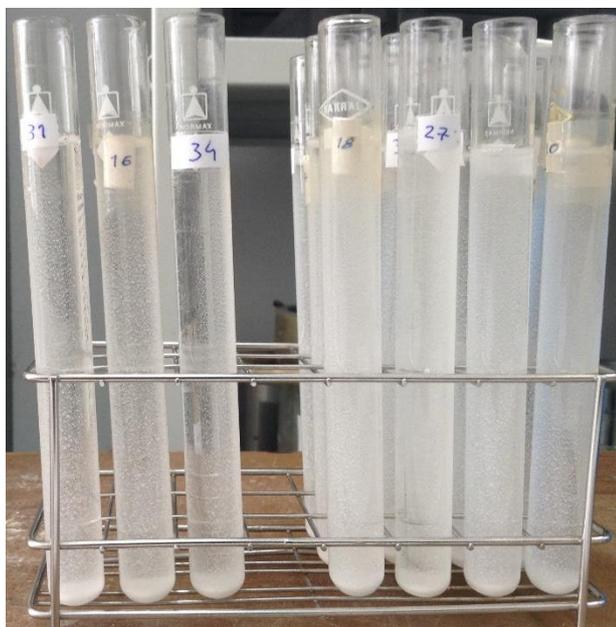


Figura 4.2 – Aspeto dos tubos de ensaio após reação de precipitação de CaCO_3 .

A lavagem dos tubos após ensaio, de maneira a retirar o carbonato de cálcio depositado, é realizada com uma solução de ácido clorídrico diluído para 25%.

4.2.3 Tratamento de dados

A massa experimental (m_e) de CaCO_3 corresponde à soma de duas parcelas: o precipitado presente no tubo de ensaio e o precipitado retido no papel de filtro. Os dados são tratados numa folha de cálculo e apresentados graficamente.

Nestes gráficos é também traçada uma linha, denominada “linha teórica”, que expressa a massa teórica (m_t), em gramas, que seria obtida para cada concentração equimolar de reagentes, caso a precipitação tivesse um rendimento de 100%.

$$m_t = C * M * V \quad (4.1)$$

A massa teórica (equação 4.1) é dada pela multiplicação da concentração (C) de reagentes ureia-CaCl₂ em mol/L, pelo volume da solução em causa (V) em litros e pela massa molar (M) do CaCO₃, que é de 100,087 g/mol (Neupane *et al.*, 2013). Esta linha permite observar graficamente a taxa de precipitado atingida em cada amostra ensaiada, que é dada pelo quociente entre a massa experimental e a massa teórica.

4.3 Preparação dos provetes de solo

Seguidamente descreve-se os procedimentos inerentes à preparação laboratorial dos provetes, desde a sua produção até ao final da cura.

4.3.1 Aparelhos e utensílios

Para a preparação laboratorial dos provetes de solo utilizam-se, para além dos materiais referidos em 4.2.1, os materiais/utensílios descritos em seguida:

- Moldes de PVC cilíndricos;
- Pilão de compactação leve;
- Vaselina;
- Fita-cola;
- Tabuleiros;
- Espátulas;
- Garfo metálico;
- Micro pipeta.
- Balança (limite erro ± 0.001 g);
- Cápsulas;
- Estufa (temperatura $105^{\circ} \pm 5^{\circ}$);
- Exsiccador;
- Sacos plásticos;
- Etiquetas;
- Extrator de provetes hidráulico;

4.3.2 Preparação da solução estabilizadora

Nesta secção descreve-se a preparação da solução estabilizadora (H₂O, ureia, CaCl₂ e *urease*), que será posteriormente misturada no solo.

Nos provetes em que a cura é feita em ambiente, a solução estabilizadora segue o procedimento de 4.2.2, com a exceção de não se filtrar a enzima *urease* antes da mistura com a solução de ureia-CaCl₂. Como a enzima do lote utilizado nesta secção se dissolve em água, a filtração deixa de ser necessária.

Nos provetes em que a cura é feita em câmara húmida, introduziu-se uma alteração no procedimento anterior, em virtude da enzima poder desnaturar ao ser mexida num grande

volume de água destilada, isto é, pode ocorrer perda de atividade. Assim, enzima é utilizada conforme as instruções de preparação do fabricante, sendo adicionada a uma solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, com uma concentração de 10 mg/mL. Ou seja, prepara-se a solução de ureia- CaCl_2 com uma dada concentração final, em que a *urease* é introduzida com uma micro pipeta sobre essa solução (o acréscimo de volume é na ordem dos microlitros, sendo desprezável na solução final).

4.3.3 Características dos provetes

As dimensões dos provetes de solo reproduzidos neste estudo são de 37 mm de diâmetro (D) e 76 mm de altura (h). Estes valores correspondem a uma razão $h/D=2:1$, estando de acordo com a norma NP EN 12390-1 (2010).

Para o referido diâmetro do provete, a máxima dimensão das partículas do solo deve ser inferior a 3,35 mm (Head, 1982). Nas condições do solo em estudo, deve assim adotar-se a fração de solo passada no peneiro ASTM de malha quadrada 2 mm (nº10), ao qual correspondem 84,52% da fração granulométrica total (ver item 3.1.1).

De maneira a possibilitar uma satisfatória reprodutibilidade dos provetes, procedeu-se à sua compactação. A energia é a correspondente ao ensaio Proctor normal (descrito em 3.1.3), de maneira a obter o peso volúmico seco máximo ($17,3 \text{ kN/m}^3$) para um teor de humidade de 12%. Como as dimensões do molde usado nesse ensaio Proctor são superiores às dimensões dos provetes reproduzidos, foi necessário, para obter o peso volúmico seco máximo, adotar em cada provete o enchimento com 8 camadas de solo, compactado com 4 pancadas por camada.

4.3.4 Procedimento utilizado em provetes compactados

Um dos processos de preparação dos provetes de solo engloba a compactação do solo com a energia de compactação justificada em 4.3.3, com base na especificação E197 (1966), LNEC. A compactação do solo para a reprodução de provetes é feita em moldes de PVC com as mesmas dimensões destes (D=37 mm e h= 76mm), de maneira a evitar o acerto de altura após cura, que pode introduzir alterações mecânicas na amostra.

Na Figura 4.3 está representado um esquema ilustrativo da compactação do solo. Numa primeira fase, coloca-se uma camada fina de vaselina nas paredes interiores dos tubos de PVC, com o objetivo de facilitar a extração do solo pós cura. Estes são obturados, com papel de filtro e fita-cola, na abertura inferior, para evitar perdas de material. É usada uma alonga no topo superior do molde para evitar desperdícios de material e permitir uma compactação vertical. Após isto, o provete é fixado numa base rígida.

Na segunda fase, para a preparação do solo num tabuleiro antes da compactação, pesam-se 180 gramas de solo seco ao qual se mistura um determinado volume de solução aquosa, dependendo

do teor em humidade pretendido. A mistura do solo é feita manualmente, com sucessivos esquarteamentos em direções cruzadas, de maneira a garantir a homogeneidade do material. De seguida dispõe-se o solo em cordão e divide-se em 8 partes sensivelmente iguais.

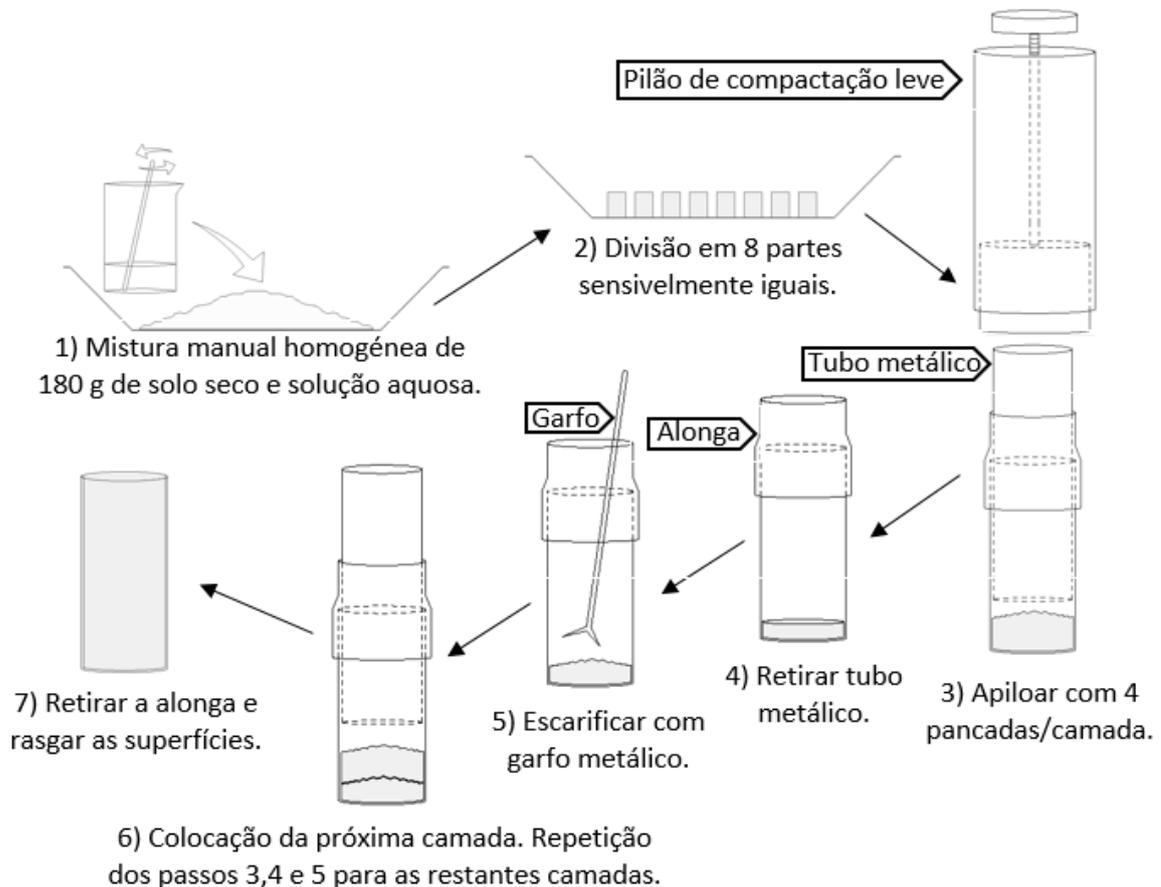


Figura 4.3 – Esquema ilustrativo do procedimento de compactação dos provetes.

Na terceira fase, inicia-se a compactação de uma das camadas, com 4 pancadas do pilão leve usado no ensaio Proctor. Como as dimensões da base do pilão são superiores às do molde de PVC é necessário usar um tubo metálico com as mesmas dimensões do molde de PVC que transmita a energia aplicada de forma uniforme sobre a superfície de solo a compactar.

A camada é em seguida escarificada com um garfo metálico, de maneira a criar uma superfície rugosa para a aplicação da segunda camada. Repete-se o procedimento até à formação da oitava camada, onde esta última deve exceder o bordo superior do molde.

Por fim, retira-se a alonga e a obturação inferior do provete, e rasgam-se cuidadosamente, com uma espátula, as superfícies dos topos do provete, preenchendo-se qualquer concavidade formada com solo.

4.3.5 Procedimento utilizado em provetes sujeitos a percolação ascendente

Outro processo de preparação dos provetes é descrito neste ponto. Esse processo consiste em submeter o solo a uma percolação ascendente com a solução aquosa (que contém o material estabilizador).

A compactação inicial dos provetes é idêntica à descrita em 4.3.4, ou seja, o solo antes de ser injetado é compactado com o procedimento descrito no item anterior, mas com água ao invés de solução estabilizadora, para o teor em água de 12% (teor de humidade ótimo). O solo mantém, assim, a mesma densidade dos provetes que são reproduzidos nessas condições.

Após ser compactado, é seco durante 3 dias numa estufa a 50°C , com o objetivo de anular o teor em humidade. Ao fim desse tempo é percolado de uma forma ascendente com solução aquosa, com uma diferença de carga hidráulica de 25 cm, aproximadamente durante 15 minutos. O esquema de percolação ascendente no solo pode ser observado na Figura 4.4.

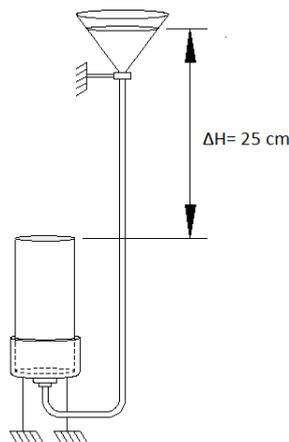


Figura 4.4 – Esquema ilustrativo da percolação ascendente.

4.3.6 Condições de cura dos provetes de solo

Após a preparação dos provetes de solo, quer os provetes compactados para um determinado teor em solução estabilizadora (item 4.3.4), quer os compactados e percolados com solução estabilizadora (item 4.3.5), são sujeitos a um tempo de cura.

Neste estudo, foram também considerados dois tipos de condições de cura, um em ambiente e outro em câmara termohigrométrica (também designada de câmara húmida). A primeira, em ambiente, remete para a colocação dos provetes, revestidos pelo tubo PVC, assentes numa superfície horizontal, em que o topo superior do provete fica em contacto direto com o ambiente envolvente (temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $60 \pm 15\%$).

A segunda, em câmara húmida, engloba a colocação dos provetes no interior de sacos plásticos, sendo armazenados na câmara termohigrométrica (temperatura de $20\pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $95\pm 5\%$) durante o tempo de cura definido.

No final do período de cura, os provetes são desmoldados com o auxílio de um extrator hidráulico, e submetidos a ensaios de compressão simples (UCS), para avaliar as características mecânicas.

4.4 Ensaios de Compressão Simples (UCS)

Esta secção descreve a metodologia correspondente aos ensaios de compressão não confinada. Na ausência de documentos normativos que definam as condições de execução dos ensaios e os critérios de conformidade para o material em estudo, adaptaram-se as normas europeias específicas para o betão (NP EN 12390-3 (2011)).

4.4.1 Procedimento de ensaio

Após o término do tempo de cura, o provete é desmoldado, recorrendo ao extrator hidráulico, e colocado na prensa *WYKEHAM FARRANCE LTD Tristar 5000kg Stepless Compression Test Machine* (Figura 4.5).



Legenda:

- 1) Célula de carga
- 2) Placa de topo rígida
- 3) Provede cilíndrico
- 4) Base rígida
- 5) Transdutor de deslocamentos

Figura 4.5 – Aspeto da realização de um ensaio UCS.

A velocidade de ensaio, que tem óbvios reflexos na resistência à compressão não confinada, foi fixada em 0,76 mm/min, ou seja, 1%/min referido à altura da amostra. A adoção deste valor encontra-se no intervalo de 0,5 a 2%/min indicado pela norma ASTM D2166 (2000).

O sistema automático de aquisição de leituras é constituído por uma célula de carga e um transdutor de deslocamento. Os valores registados, num período de tempo fixado em 3 segundos, são convertidos em força e deslocamento através do *software* “Triax”, desenvolvido na Universidade de Durham, em Inglaterra (Toll, 1990).

4.4.2 Tratamento de dados

A partir dos valores de força (F), da variação do deslocamento vertical ($\Delta\delta_v$) e das dimensões dos provetes - diâmetro da secção transversal (D) e altura (h) – expressa-se, numa folha de cálculo, o valor da tensão de compressão (equação 4.2) e da extensão axial (equação 4.3) em cada instante (Head, 1982).

A tensão axial é dependente da força medida na célula de carga e da área da secção transversal. Quanto à força medida diretamente na célula de carga, assume-se que o erro resultante da sua leitura é desprezável. Em relação à área transversal da amostra, esta deve ser corrigida (A_{corr}) fruto das deformações radiais que ocorrem durante o ensaio (equação 4.4) (Head, 1982).

$$q_u = \frac{F}{A_{corr}} \quad (4.2)$$

$$\varepsilon_a = \frac{\Delta\delta_v}{h} \times 100 \quad (4.3)$$

$$A_{corr} = \frac{\pi \times D^2}{4 \left(1 - \frac{\varepsilon_a}{100}\right)} \quad (4.4)$$

Depois destes parâmetros calculados pode-se representar a curva tensão-extensão axial (q_u - ε_a) para cada um dos provetes submetidos a ensaios UCS, onde, quando necessário, procede-se à eliminação do *bedding-error*. A rotura é caracterizada pelo valor máximo de tensão de compressão do provete, sendo representada por $q_u^{máx}$.

4.5 Ensaio SEM e XRD

Para identificar a presença de CaCO₃ nas amostras de solo bioestabilizado e em tubos de ensaio são realizados ensaios XRD. Para as amostras de solo, adicionalmente, são realizadas fotografias microscópicas com análise química, ensaio SEM. Os ensaios referidos são realizados no Instituto Pedro Nunes.

O equipamento utilizado nos ensaios XRD é *Philips X'Pert*, onde a fonte de raio X é uma ampola de cobalto ($k\alpha_1 = 1.78897 \text{ \AA}$). A gama de ângulos é de 5 a 80°, onde as leituras são executadas com intervalos de um segundo e um incremento de 0,025°. Após o ensaio, os resultados são comparados com uma base de dados (ICDD), de maneira a verificar a existência de cristais de CaCO₃.

O equipamento utilizado nos ensaios SEM é um microscópio eletrónico de varredura *Zeiss Merlin Compact/VPCompact*. A análise química associada é realizada por um sistema de espectrometria por raios X por energia dispersiva, da marca *Oxford, X-Maxn*.

4.6 Plano de ensaios

Neste subcapítulo é apresentado o plano de ensaios laboratoriais. Está dividido em três secções, uma que remete para a precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio, outra para os provetes de solo compactados, e a última que aborda os provetes de solo submetidos a percolação.

4.6.1 Precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio

O plano de ensaios da precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio engloba a quantificação em peso do precipitado formado em função da concentração equimolar dos reagentes ureia-CaCl₂, da quantidade de *urease* e do tempo de reação. O plano está representado no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Plano de ensaio para a precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio

		Dosagem de <i>urease</i> (kU/L)			
		1	2	4	8
Concentração de ureia-CaCl ₂ (mol/L)	0,25	o	o	+ Δ o x	+ Δ o
	0,5	o	o	+ Δ o x	+ Δ o
	0,75	o	o	+ Δ o x	+ Δ o
	1	o	o	+ Δ o x	+ Δ o
	1,25	o	o	+ Δ o x	+ Δ o
Legenda do tempo de reação: “+” 1 dia; “Δ” 7 dias; “o” 14 dias; “x” 28 dias					

Os ensaios de difração de raio X são realizados para duas amostras de precipitado com 1 e 7 dias de tempo de reação, provenientes de soluções com concentração equimolar de ureia-CaCl₂ de 0,5 mol/L e uma concentração de *urease* 4 kU/L.

4.6.2 Provetes de solo compactados

Após a análise de resultados da precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaios, procedimento descrito em 4.2, definiu-se para o “ensaio base” as seguintes características: 0,75 mol/L de

solução equimolar de ureia-CaCl₂, 4 kU/L de enzima *urease*, 12% de teor em solução aquosa e 14 dias de cura.

Os parâmetros de ensaio (tempo de cura, concentração de reagentes e da enzima *urease* e teor em solução estabilizadora) variam em torno dos valores do ensaio base.

O conjunto de ensaio consiste em fazer variar um dos fatores do ensaio base, mantendo os restantes constantes. O plano de ensaios pode dividir-se em 4 subplanos, correspondente cada um à variação de um desses fatores:

- A) Variação do teor da solução estabilizadora (8-10-14-16-18 %).
- B) Variação da quantidade de *urease* (1-2-8-12-24 kU/L).
- C) Variação do tempo de cura (1-3-7-14-21-28 dias).
- D) Variação da quantidade de reagentes (0,063-0,125-0,25-0,5-1,0-1,25 mol/L).

Quadro 4.2 - Plano de ensaios dos provetes compactados.

Subplano	Nome	Concentração ureia-CaCl ₂ (mol/L)	Concentração <i>urease</i> (kU/L)	Teor em solução (%)	Tempo de cura (dias)	Condições de cura	
						Ambiente	Câmara Húmida
Sem estabilização	SE_8	0	0	8	14		X
	SE_12	0	0	12	14	X	X
	SE_16	0	0	16	14		X
Ensaio base	BASE	0,750	4	12	14	X	X
A. Variação do teor em solução estabilizadora	A_8	0,750	4	8	14	X	X
	A_10			10		X	
	A_14			14		X	
	A_16			16		X	X
	A_18			18		X	
B. Variação da quantidade de <i>urease</i>	B_1	0,750	1	12	14	X	
	B_2		2			X	X
	B_8		8			X	X
	B_12		12			X	X
	B_24		24				X
C. Variação do tempo de cura	C_1	0,750	4	12	1		X
	C_3				3		X
	C_7				7		X
	C_21				21		X
	C_28				28	X	X
D. Variação da quantidade de reagentes	D_0,063	0,063	4	12	14	X	
	D_0,125	0,125				X	X
	D_0,250	0,250				X	X
	D_0,500	0,500				X	X
	D_1,000	1,000				X	X
	D_1,250	1,250				X	X

Os planos encontram-se detalhados no Quadro 4.2. Nesse Quadro, os ensaios a realizar para as duas condições de cura, ambiente ou em câmara húmida, estão assinaladas com um “X”. Repare-se que a nomenclatura utilizada é composta pela designação do subplano de ensaio correspondente, seguido do fator a variar de acordo com o subplano a que se refere (p.ex: A_8 corresponde ao plano de ensaios “A) Variação do teor da solução estabilizadora”, no qual se altera o teor em solução de 12% para 8%.

É de referir que cada combinação é repetida para verificar a reprodutibilidade. Para a cura em ambiente, a repetição é de 3 provetes por combinação. Quando os provetes são colocados na câmara húmida a repetição é igual a 2.

4.6.3 Provetes com percolação ascendente no solo

Nesta secção apresenta-se o plano de ensaios da percolação no solo, detalhado no Quadro 4.3. Novamente, os ensaios a realizar para as duas condições de cura, ambiente ou em câmara húmida, estão assinaladas com um “X”.

A nomenclatura utilizada é composta pela designação do plano de ensaio correspondente, seguido da concentração de ureia-CaCl₂ e da concentração de *urease* (p. ex: P_0,25_4, corresponde ao plano de percolação, com 0,25 mol/L de ureia-CaCl₂ e 4 kU/L de *urease*).

Os provetes, quando submetidos a uma cura em ambiente, a repetição é igual a 3, quando colocados na câmara húmida a repetição é de 2 provetes por combinação.

Quadro 4.3 - Plano de ensaios dos provetes sujeitos a percolação.

Subplano	Nome	Concentração ureia-CaCl ₂ (mol/L)	Concentração <i>urease</i> (kU/L)	Tempo de cura (dias)	Condições de cura	
					Ambiente	Câmara Húmida
Sem estabilização	SE_0_0	0	0	14		X
Percolação	P_0,25_4	0,25	4		X	
	P_0,25_8		8		X	
	P_0,25_12		12		X	
	P_0,75_4	0,75	4		X	
	P_0,75_8		8		X	
	P_0,75_12		12		X	X

5 ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1 Introdução

Neste capítulo apresentam-se e criticam-se os resultados obtidos nos ensaios realizados para o estudo da influência da enzima *urease* e dos reagentes ureia e CaCl_2 no processo de precipitação de CaCO_3 , em tubos de ensaio e quando adicionados ao solo, de modo a promover a sua bioestabilização.

Na próxima secção, que engloba os resultados da precipitação de carbonato de cálcio em tubos de ensaio, os parâmetros objeto do estudo são a dosagem de enzima *urease*, a concentração de ureia- CaCl_2 e o tempo de reação de precipitação. Segue-se uma secção com os resultados laboratoriais dos provetes compactados com cura em câmara húmida e outra secção para as amostras curadas em ambiente. Por último, apresentam-se os resultados dos provetes sujeitos a percolação nas duas condições de cura referidas.

5.2 Precipitação de CaCO_3 em tubos de ensaio

Nesta secção apresentam-se os resultados do doseamento da enzima *urease* e do efeito do tempo, bem como a sua interação com a concentração dos reagentes ureia- CaCl_2 .

Aa Figura 5.1 ilustra, para um tempo de reação de 14 dias, a influência da dosagem da enzima *urease* (entre 1 e 8 kU/L) e da concentração de ureia- CaCl_2 na quantidade de CaCO_3 precipitado, observando-se com o acréscimo de *urease* (para a mesma concentração de ureia- CaCl_2) o aumento da quantidade de material precipitado.

Nota-se ainda que existe um efeito inibidor na enzima *urease* para concentrações de ureia- CaCl_2 mais elevadas, levando a que a massa precipitada se afaste da “linha teórica”, i.e., sendo inferior ao valor teórico de uma reação de precipitação completa (abordado em 4.2.3). Repare-se que caso não existisse essa inibição, por exemplo, na curva de 1 kU/L todas as concentrações estudadas conseguiriam formar um valor igual ou superior à concentração mais baixa em estudo, 0,25 mol/L. Este efeito de inibição da atividade da *urease* quando a concentração de ureia- CaCl_2 é muito elevada foi também observado por Yasuhara *et al.* (2012).

Para uma concentração de 0,25 mol/L de ureia- CaCl_2 basta 1 kU/L de *urease* para se precipitar praticamente a totalidade dos reagentes e para uma concentração de 0,75 mol/L já é necessário

uma quantidade de enzima de 8 kU/L. Assim, o aumento da quantidade de reagentes requer, para o seu consumo, um aumento da quantidade de enzima *urease*, de forma a desencadear taxas de precipitação mais próximas da linha teórica.

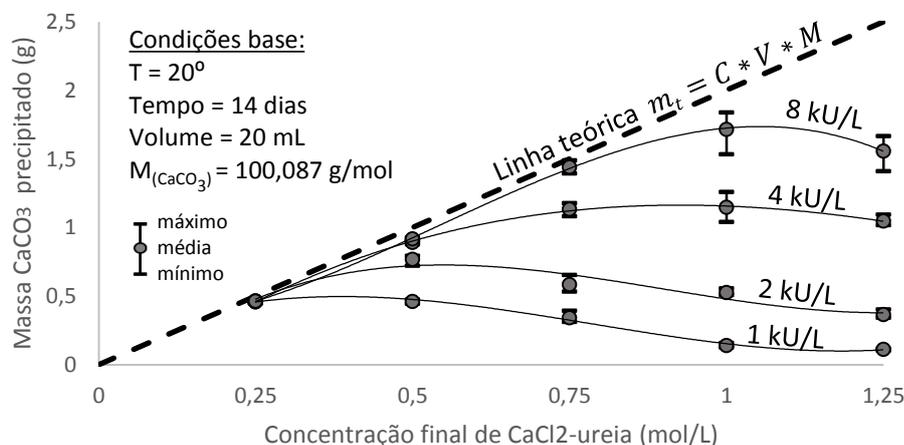


Figura 5.1 – Quantificação de CaCO_3 precipitado em tubos de ensaio: Influência da quantidade de *urease* com a concentração de ureia- CaCl_2 .

Na globalidade, a Figura 5.1 sugere existir uma concentração ótima para cada curva de *urease* para a qual se atinge uma massa de CaCO_3 máxima. Assim, para 1, 2, 4 e 8 kU/L de *urease* corresponde uma concentração ótima de ureia- CaCl_2 de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mol/L, respetivamente.

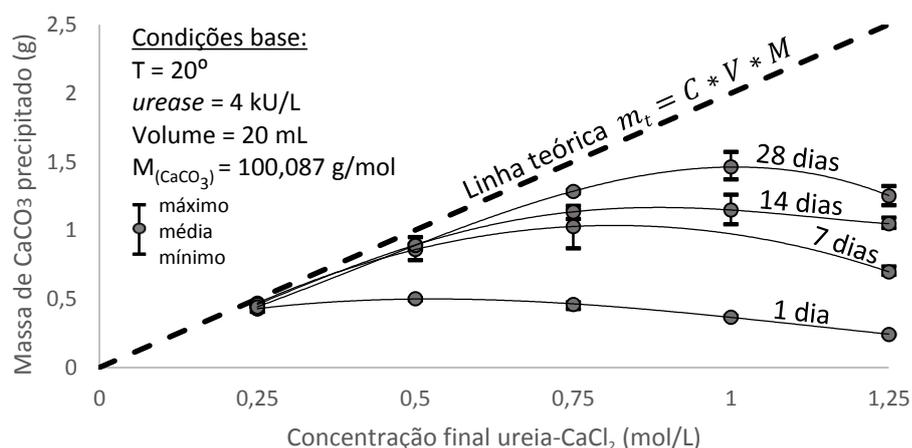


Figura 5.2 – Quantificação de CaCO_3 precipitado em tubos de ensaio: Influência do tempo de reação com a concentração de ureia- CaCl_2 .

Na Figura 5.2 apresenta-se, para a quantidade de reagentes em estudo, a influência da variação do tempo da reação de precipitação (1, 7, 14 e 28 dias) na quantidade de material precipitado, para uma quantidade de *urease* de 4 kU/L. Pode-se reter que a formação de carbonato de cálcio

é crescente no tempo, sendo um processo mais expressivo nos primeiros 7 dias, obtendo-se uma quantidade de CaCO₃ semelhante ao valor teórico para concentrações mais baixas.

Para concentrações de reagentes superiores a 0,75 mol/L ainda se verifica um potencial de crescimento aos 28 dias, obtendo-se uma curva de 4 kU/L aos 28 dias próxima da curva de 8 kU/L aos 14 dias (Figura 5.1), exibindo assim um efeito benéfico do tempo no processo químico.

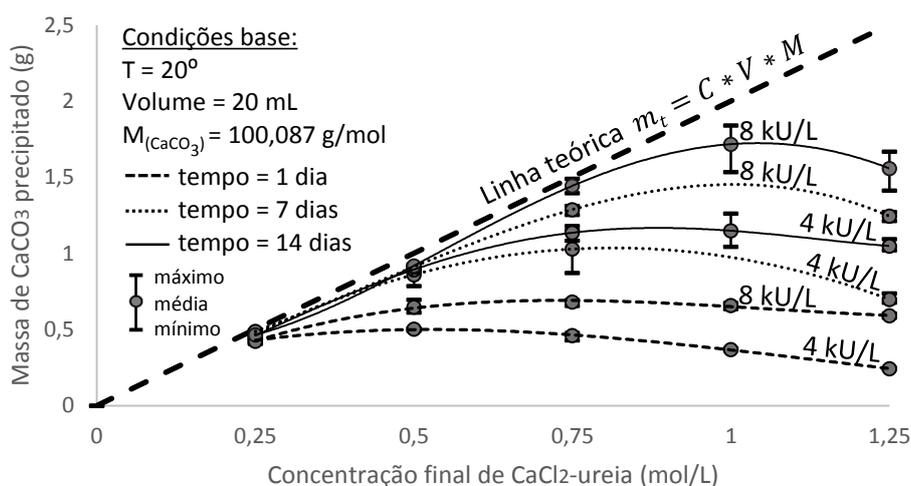


Figura 5.3 – Quantificação de CaCO₃ precipitado em tubos de ensaio: Influência do tempo de reação e da quantidade de *urease* com a concentração de ureia-CaCl₂.

Da mesma forma, na Figura 5.3, apresentam-se as curvas de variação do tempo de reação (1, 7 e 14 dias) para duas dosagens de *urease*, 4 e 8 kU/L. Constata-se a existência do aumento de precipitação com o aumento de *urease* e com o tempo. Anota-se que para uma dosagem de *urease* de 8 kU/L, a massa de CaCO₃ precipitada aproxima-se da linha teórica, conduzindo a melhores resultados ao fim de 7 dias do que uma dosagem de 4 kU/L aos 14 dias. Ou seja, para estes níveis de dosagem, o aumento da quantidade de *urease* revela-se mais eficaz do que o aumento do tempo de reação.

Os ensaios XRD (Figura 5.4), realizados para duas amostras do material precipitado nos tubos de ensaio, com concentração de ureia-CaCl₂ de 0,5 mol/L e com uma dosagem de *urease* de 4 kU/L, para os tempos de reação de 1 e 7 dias, corroboram que o precipitado formado é CaCO₃, sendo identificados como calcite e vaterite.

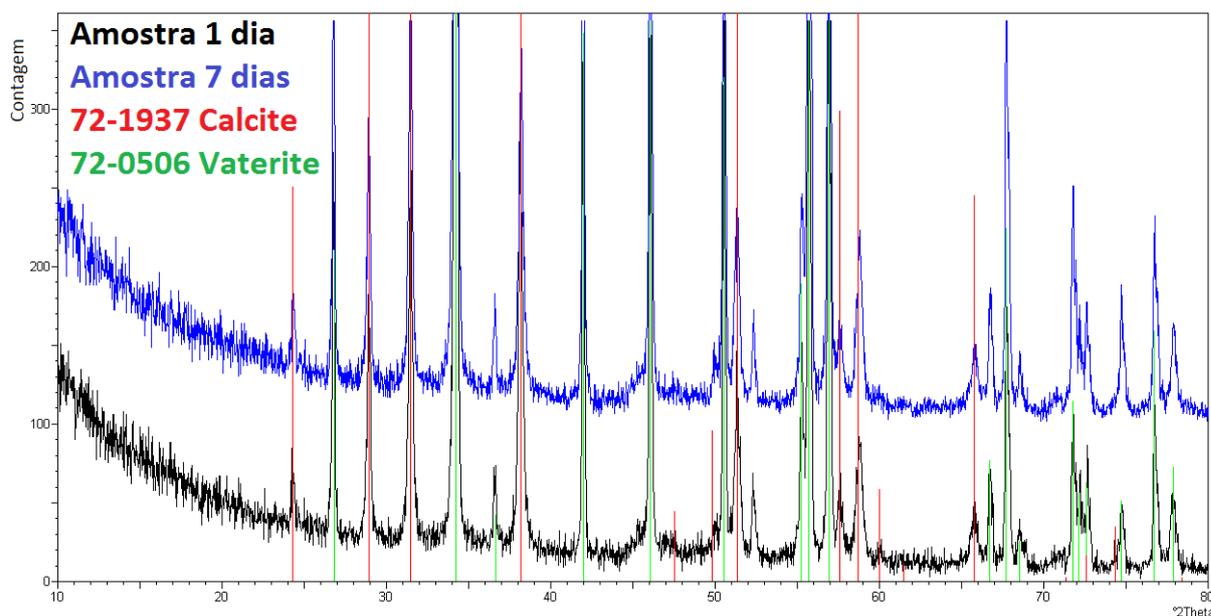


Figura 5.4 – Resultados de ensaio XRD em amostras de tubo de ensaio.

Os resultados apresentados nesta secção dão uma ideia do comportamento enzimático no tempo e a sua interação com diferentes concentrações de ureia- CaCl_2 , bem como uma informação da quantidade de CaCO_3 precipitado.

É de referir que estes valores permitiram definir o ensaio base para os provetes de solo, embora não devam ser diretamente extrapoláveis para esses ensaios, onde as características como a granulometria do solo, o seu pH ou as impurezas presentes podem modificar as condições de ensaio e, conseqüentemente, os valores da quantidade de precipitado.

5.3 Provetes compactados com cura em câmara húmida

Nesta secção apresentam-se os resultados dos ensaios UCS para os provetes de solo compactados com cura em câmara húmida.

Para a análise de resultados assume-se que a quantidade de CaCO_3 precipitado no solo, no processo de bioestabilização, é diretamente proporcional ao aumento da resistência mecânica e da rigidez, visto que a medição efetiva da quantidade de precipitado está fora do âmbito deste estudo, por requerer metodologias químicas específicas.

Essa hipótese deve ter em conta que existem outros fatores que podem influenciar os ganhos de resistência mecânica, entre os quais a distribuição uniforme do CaCO_3 no provete, o teor em humidade de ensaio, a própria variabilidade do material terroso e as condições de preparação de cada provete.

Quadro 5.1 – Resumo dos resultados dos ensaios UCS com cura em câmara húmida.

Subplano	Ensaio	q _u ^{máx} (kPa)	E _{u50} (MPa)	W _{inicial} (%)	W _{final} (%)	pH
Sem estabilização	SE_8_1	18,3	1,6	7,7	7,6	8,4
	SE_8_2	23,0	0,7	7,2	7,8	
	SE_12_1	15,5	0,9	11,3	11,4	
	SE_12_2	20,7	1,0	11,1	11,6	
	SE_16_1	28,4	1,6	17,3	13,6	
	SE_16_2	33,6	2,6	17,4	14,1	
Base	BASE_1	26,0	1,6	10,0	10,4	7,7
	BASE_2	31,0	1,6	9,4	11,8	7,6
A - Variação do teor em solução estabilizadora	A_8_1	33,4	1,2	6,4	7,7	7,6
	A_8_2	15,7	1,6	6,7	10,3	7,7
	A_16_1	38,9	2,7	16,1	12,6	7,7
	A_16_2	43,8	2,2	15,8	11,8	7,6
B - Variação da quantidade de <i>urease</i>	B_2_1	25,7	1,5	10,3	11,2	7,8
	B_2_2	23,3	1,2	10,3	11,0	7,8
	B_8_1	31,2	2,4	10,1	10,2	7,7
	B_8_2	31,1	2,2	10,5	10,4	7,7
	B_12_1	28,6	2,5	10,8	11,3	7,7
	B_12_2	33,3	2,0	10,5	12,1	7,7
	B_24_1	25,7	2,2	11,4	10,7	7,7
	B_24_2	30,6	2,2	11,5	11,2	7,7
C - Variação do tempo de cura	C_1_1	18,1	1,1	10,6	10,9	7,9
	C_1_2	26,0	1,5	10,2	10,6	7,8
	C_3_1	33,4	1,3	10,8	11,2	7,9
	C_3_2	23,3	1,8	11,0	10,9	7,9
	C_7_1	33,7	2,0	10,2	10,5	7,5
	C_7_2	36,3	2,7	10,6	10,7	7,5
	C_21_1	33,6	1,7	10,3	10,6	7,5
	C_21_2	33,6	1,6	10,3	10,4	7,5
	C_28_1	36,0	1,9	10,2	10,8	7,6
	C_28_2	33,7	2,3	10,3	10,9	7,6
D - Variação da quantidade de reagentes	C_0,125_1	17,9	0,8	11,0	11,7	8,0
	C_0,125_2	25,6	0,8	11,4	14,7	7,9
	C_0,250_1	20,7	1,0	11,3	11,2	7,8
	C_0,250_2	28,2	1,4	11,2	11,2	7,8
	C_0,500_1	28,3	1,4	9,9	13,6	7,7
	C_0,500_2	23,2	1,0	10,6	11,0	7,7
	C_1,000_1	33,1	1,4	10,3	10,6	7,6
	C_1,000_2	23,0	1,0	10,7	10,3	7,7
	C_1,250_1	23,3	1,4	11,1	9,9	7,5
	C_1,250_2	20,6	1,3	10,7	10,3	7,4

O Quadro 5.1 apresenta os valores da resistência à compressão não confinada na rotura (q_u^{máx}), do módulo de deformabilidade para 50% da carga de rotura (E_{u50}), dos teores em humidade inicial e final e do pH.

Os valores de pH são realizados de acordo com o procedimento descrito em 3.1.6.

5.3.1 Variação da quantidade de *urease*

Na Figura 5.5 apresentam-se os resultados que retratam a influência da quantidade de *urease* na resistência (q_u) e do módulo deformabilidade (E_{u50}) de solo estabilizado por via enzimática, mantendo constante a concentração de ureia- CaCl_2 .

Em termos médios, observa-se com o aumento da quantidade de *urease* o incremento da tensão última (q_u) e do módulo de deformabilidade (E_{u50}), até um valor de 8kU/L, seguindo-se um patamar aproximadamente horizontal ou com uma ligeira descida (para q_u).

Considerando que o aumento de resistência mecânica é proporcional ao aumento de CaCO_3 , a Figura 5.5 sugere que 8 kU/L de *urease* são suficientes para otimizar a maior massa de precipitado nestas condições.

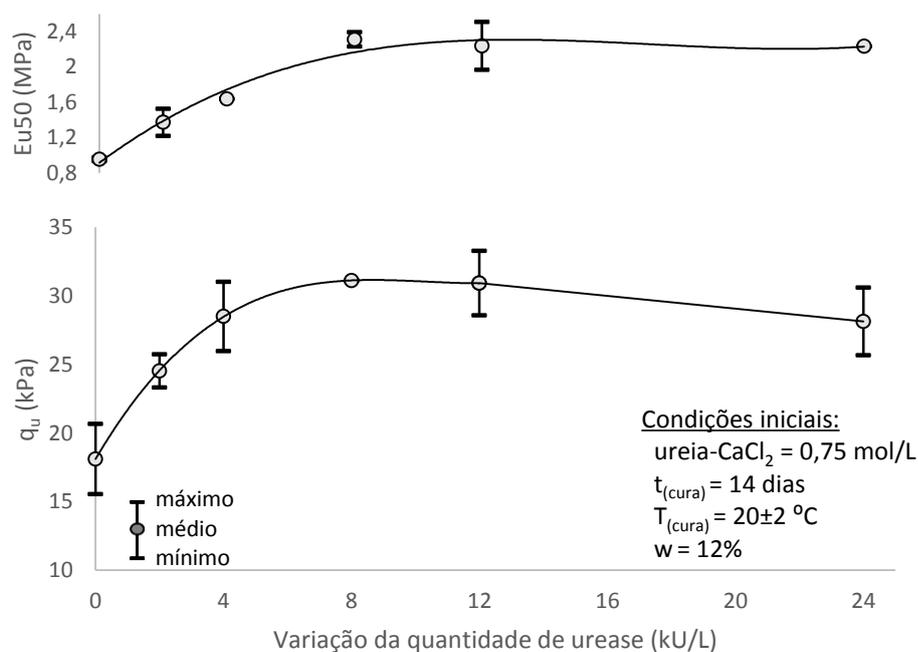


Figura 5.5 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com a variação da quantidade de *urease*.

Na Figura 5.6 estão representadas as curvas tensão-extensão axial do presente subplano, evidenciando a existência de um troço linear elástico até à rotura, seguido de uma descida progressiva da capacidade resistente, em resultado da degradação progressiva da biocimentação.

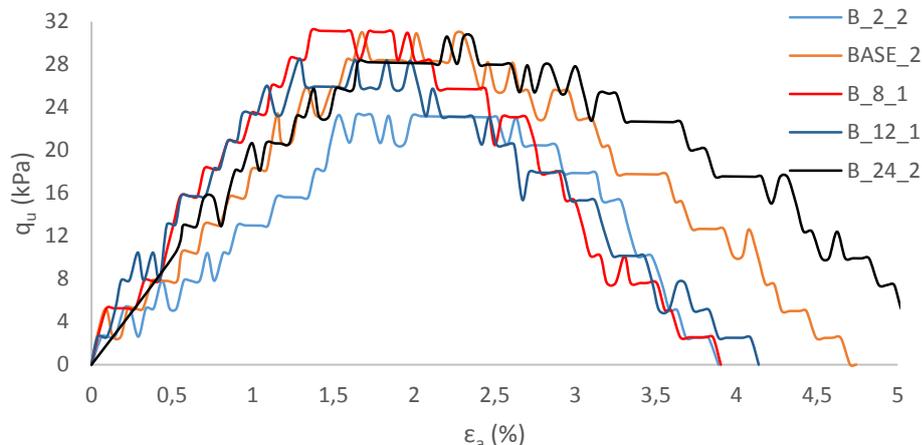


Figura 5.6 – Ensaio UCS: Curva tensão-elongação axial para o subplano B.

5.3.2 Variação da concentração de ureia- CaCl_2

A influência da concentração de ureia- CaCl_2 no comportamento mecânica do solo bioestabilizado (Figura 5.7) mostra, em termos médios, uma melhoria da resistência e rigidez até uma concentração de 0,75 mol/L, decrescendo após 1 mol/L.

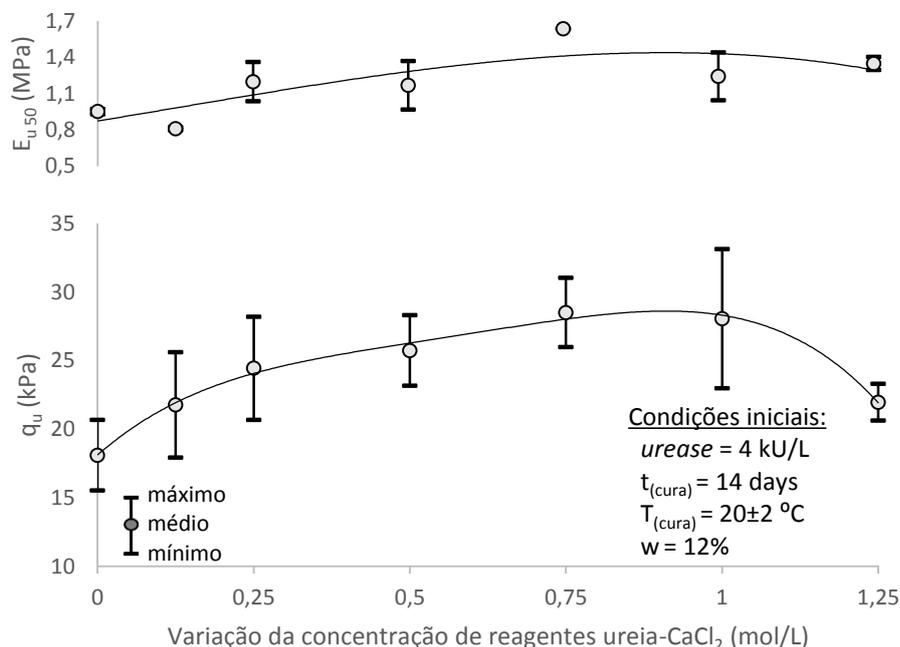


Figura 5.7 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com a variação de ureia- CaCl_2 .

Observa-se uma tendência semelhante ao obtido no estudo com tubos de ensaio ao fim de 14 dias (Figura 5.2). Assumindo que o aumento de tensão última está diretamente relacionado com a quantidade de CaCO_3 precipitado, essa tendência revela também que existe um efeito de inibição da enzima *urease* para valores de ureia- CaCl_2 superiores a 1 mol/L.

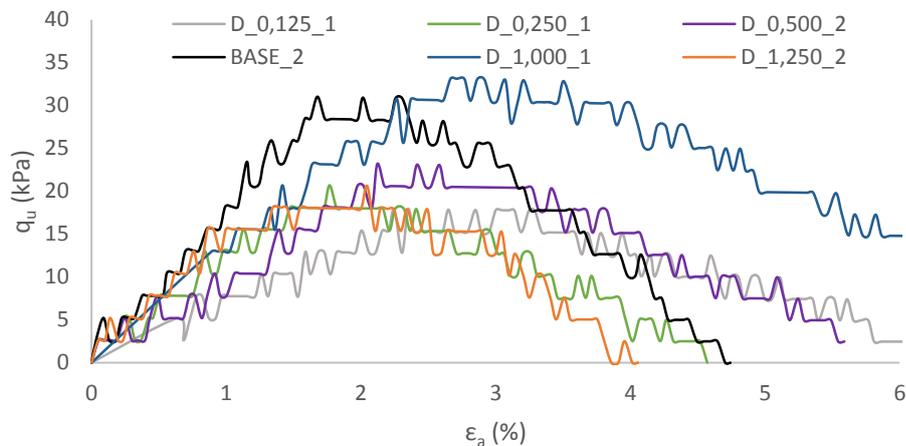


Figura 5.8 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão para o subplano D.

Na Figura 5.8 estão representadas as curvas de tensão-extensão axial, observando-se para a curva D_1,000_1 uma descida mais suave da resistência pós-pico.

5.3.3 Variação do tempo de cura

A Figura 5.9 retrata a influência do tempo de cura no processo de bioestabilização.

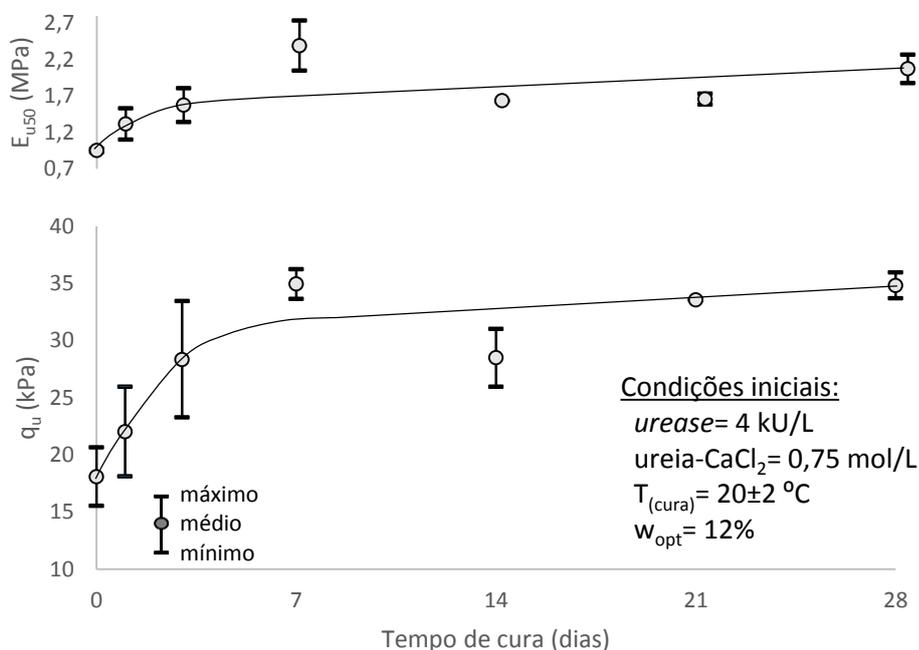


Figura 5.9 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com a variação do tempo de cura.

Constata-se, em termos globais, que o aumento da resistência mecânica é mais notório nos primeiros sete dias, seguindo depois uma tendência crescente menos acentuada. Estes

resultados corroboram os ilustrados na Figura 5.2 com tubos de ensaio, em que a maior parte do precipitado se forma nos primeiros sete dias, seguindo-se um crescimento menos acentuado com o aumento do tempo.

Na Figura 5.10 estão representadas as curvas de tensão-extensão axial do presente subplano de ensaios, revelando um comportamento semelhante ao descrito na Figura 5.6.

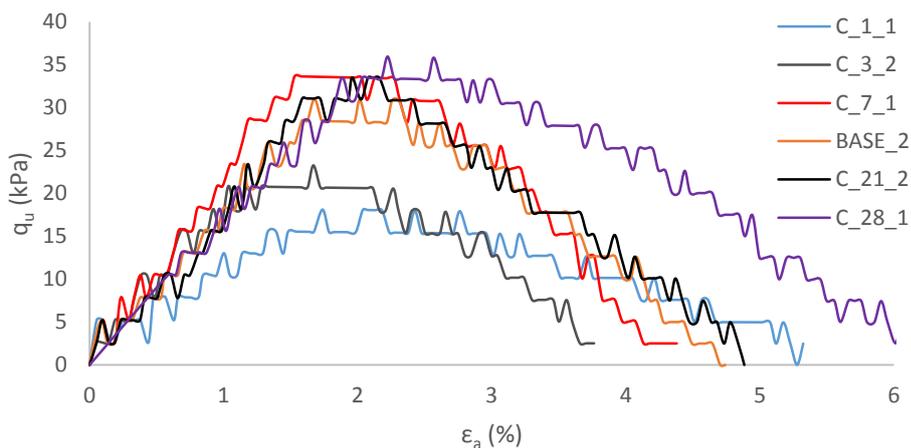


Figura 5.10 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão para o subplano C.

5.3.4 Variação do teor em solução estabilizadora

A variação do teor em solução estabilizadora, retratada na Figura 5.11, mostra que o solo estabilizado apresenta uma melhoria das características mecânicas (q_u e E_{u50}) com o aumento do teor em solução estabilizadora.

Em termos médios, existem maiores ganhos relativos para um teor em solução de 12 e 16%, em relação a 8%, revelando, como seria de esperar, um aumento da precipitação de CaCO_3 .

Os ganhos efetivos com 12 e 16% de teor em solução estabilizadora são aproximadamente idênticos, para um tempo de cura de 14 dias.

Para um teor em solução superior, as reações químicas podem dar-se de forma mais lenta, sendo que o efeito tempo pode contribuir para a melhoria das propriedades mecânicas da mistura bioestabilizada.

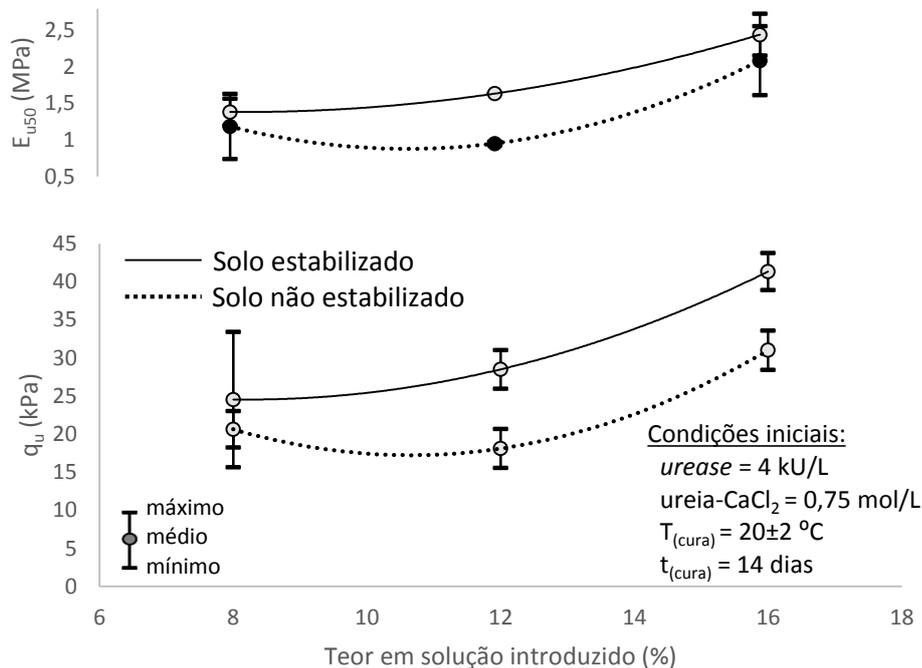


Figura 5.11 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com o teor em solução.

Na Figura 5.12 estão representadas as curvas de tensão-extensão axial do presente subplano de ensaios, onde se observa o claro aumento de q_u e E_{u50} com o aumento da solução estabilizadora.

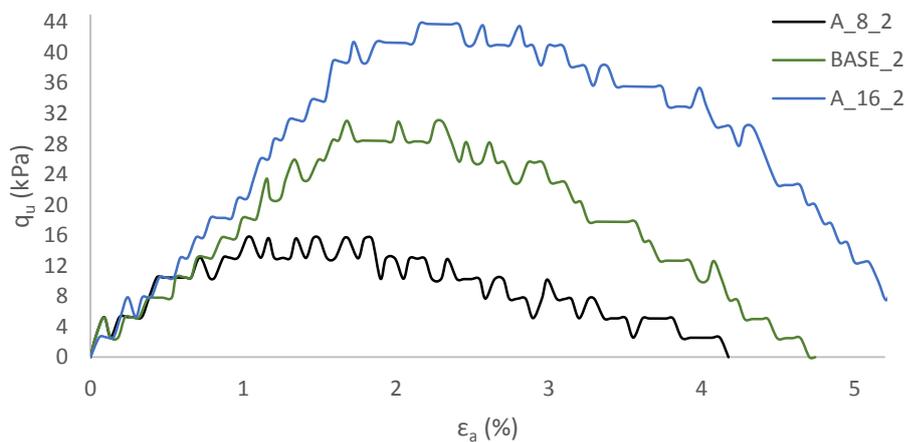


Figura 5.12 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão para o subplano A.

A Figura 5.13 mostra a sobreposição dos resultados dos ensaios XRD realizado sobre uma amostra de solo natural e outra de solo bioestabilizado (provete A_16_2).

Embora o ensaio sobre o solo natural indique já a presença de partículas de carbonato de cálcio, constata-se a existência de um ligeiro aumento dos picos homólogos de calcite e vaterite no solo bioestabilizado, confirmando o efeito da bioestabilização.

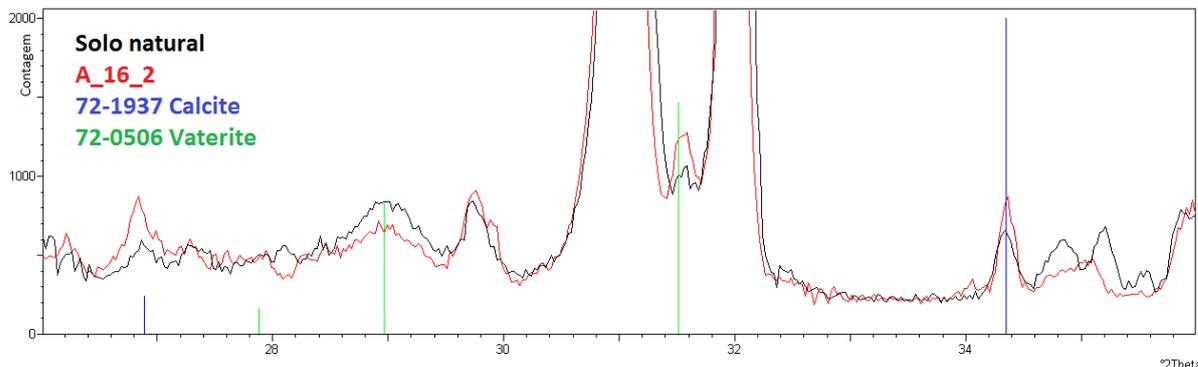


Figura 5.13 – Ensaio XRD do solo natural e do solo bioestabilizado (provete A_16_2)

5.3.5 Variação do pH

Na Figura 5.14, interpreta-se que o aumento da concentração de ureia- CaCl_2 promove a diminuição do pH do solo natural, aproximando-se de um solo neutro.

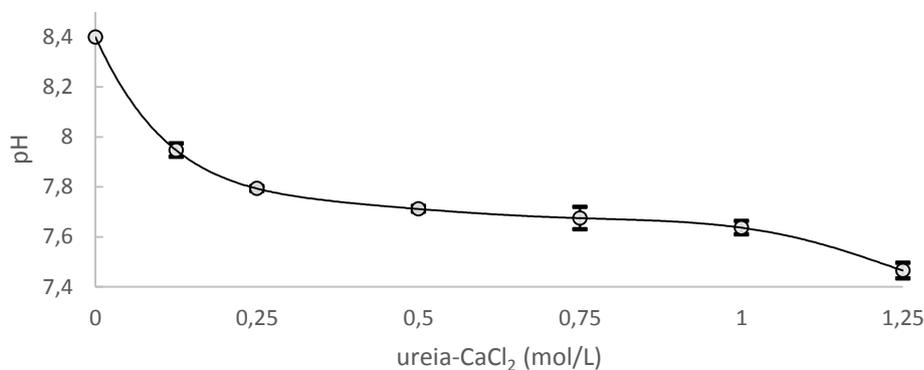


Figura 5.14 – Evolução do pH com a concentração de ureia- CaCl_2 .

Na Figura 5.15, agrupando os ganhos de resistência do ensaio base e dos subplanos de ensaios B e C, em que a concentração de ureia- CaCl_2 é de 0,75 mol/L, observa-se uma tendência crescente da resistência máxima à compressão uniaxial, com a redução do pH do solo.

Na equação 1.4, existe, numa primeira fase, um aumento de pH que favorece a formação do ião carbonato. Quando a reação se processa ocorre o consumo dos produtos envolvidos que promovem a acidificação do meio (equação 1.5), originando a redução de pH. Assim sendo, a diminuição de pH observado na Figura 5.15 pode indicar que, numa segunda fase (equação 1.5)

possa ocorrer a formação de maior quantidade de CaCO_3 , associada, por sua vez, a um aumento da resistência mecânica.

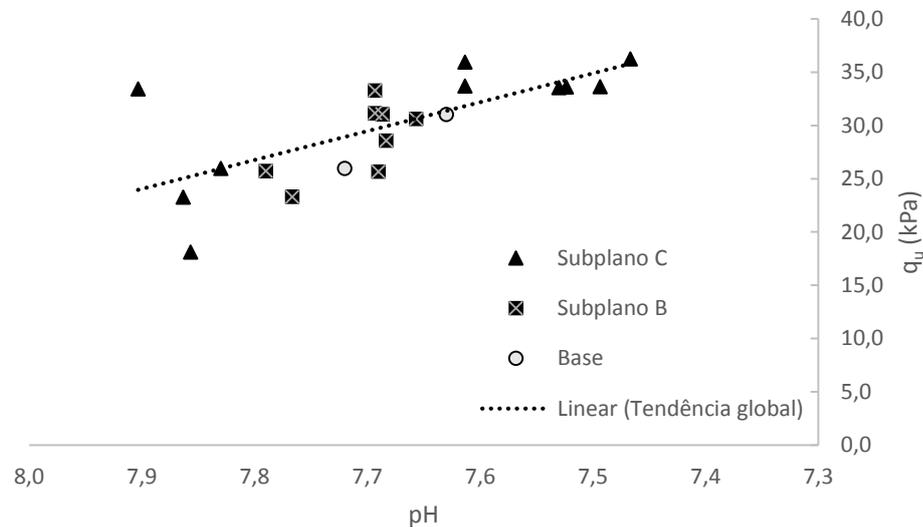


Figura 5.15 – Evolução de q_u com o pH para o ensaio base e subplanos B e C.

5.4 Provetes compactados com cura em ambiente

Nesta secção apresentam-se os resultados de ensaios UCS em provetes compactados com cura em ambiente. A resistência à compressão simples não confinada e o módulo de deformabilidade são representados graficamente para os subplanos de ensaios descritos em 4.6.2.

5.4.1 Variação da quantidade de ureia- CaCl_2

A Figura 5.16 indica que a resistência à compressão e o módulo de deformabilidade, ao contrário do que seria de esperar, vão diminuindo progressivamente com o aumento da concentração de ureia- CaCl_2 .

Este comportamento é devido às condições de cura em ambiente, onde se geram fenómenos de sucção, mascarando os eventuais ganhos de resistência por bioestabilização. De facto, quando a cura dos provetes se processa em contacto direto com o ambiente envolvente (temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e humidade relativa de $60 \pm 15\%$), o solo vai secando, originando sucção, que se traduz em pressões na água dos poros negativas, que, por via do princípio de tensão efetiva, geram um aumento das tensões efetivas.

De um modo geral, observou-se visualmente que os provetes com maiores concentrações de ureia- CaCl_2 apresentavam um aspeto mais molhado, retendo maior humidade no solo, o que conduz a menores valores de sucção, logo menores tensões efetivas e consequentemente menores características mecânicas.

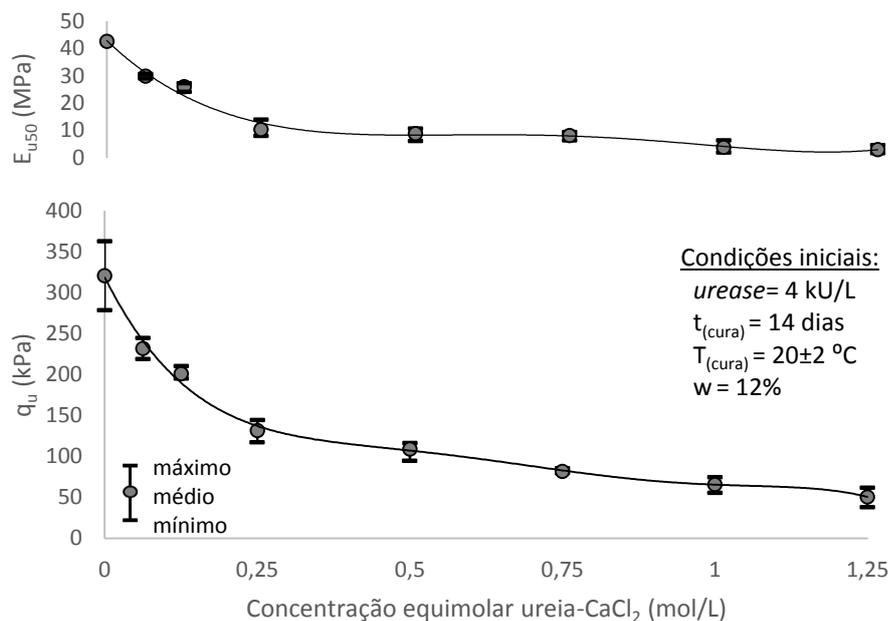


Figura 5.16 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com a concentração de ureia- CaCl_2 .

Em resultado deste comportamento, observa-se que nos provetes não estabilizados (concentração de reagentes nula) se registam os maiores parâmetros mecânicos, q_u e E_{u50} , correspondendo assim às maiores sucções.

5.4.2 Variação do teor em solução estabilizadora

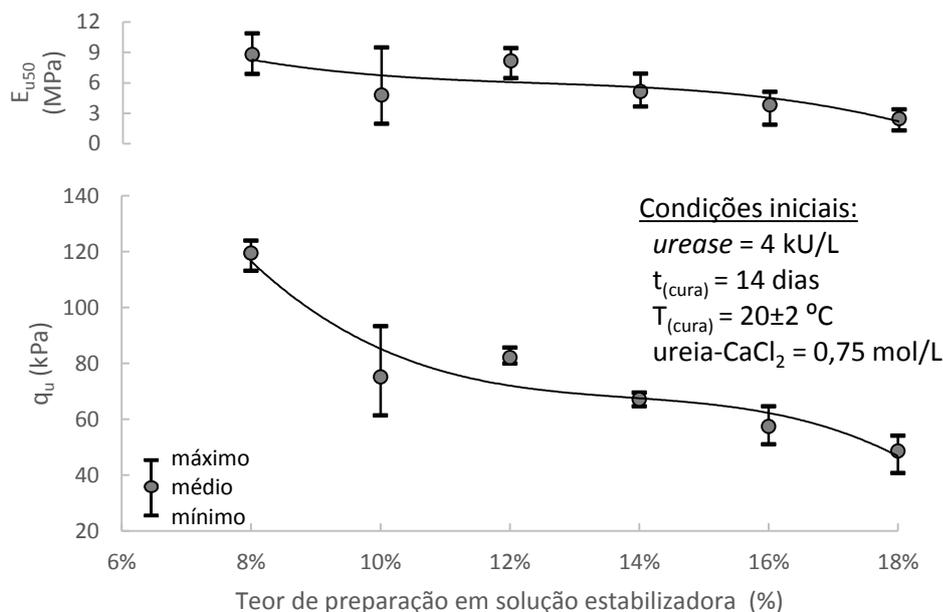


Figura 5.17 – Ensaio UCS: Evolução do q_u e do E_{u50} com o teor em solução estabilizadora.

A Figura 5.17 sugere que, para um aumento de solução estabilizadora, a tensão última e a rigidez diminuem, em resultado da diminuição da sucção, como se referiu em 5.4.1.

Julga-se que estes valores voltam novamente a mascarar os ganhos de resistência por bioestabilização, onde seria de esperar que um maior volume de solução gerasse maiores precipitações de CaCO_3 , e que, com mais ligações entre partículas a resistência fosse assim superior.

Note-se que a reação química de precipitação de CaCO_3 implica um “consumo” de água reduzido, pelo que, à partida, os efeitos de sucção participam com maior intensidade no aumento de resistência mecânica do solo. Assim a condição de cura em câmara húmida, onde os fenómenos de sucção se fazem sentir parcamente, é mais indicada para avaliar laboratorialmente os ganhos efetivos dos parâmetros de resistência no solo bioestabilizado.

5.4.3 Variação da quantidade de *urease*

Avaliando o efeito da dosagem de enzima *urease* na resistência à compressão não confinada e o módulo de deformabilidade (Figuras 5.18 e 5.19), observa-se, em geral, com o aumento da quantidade de *urease* uma melhoria das propriedades mecânicas do solo biocalcificado.

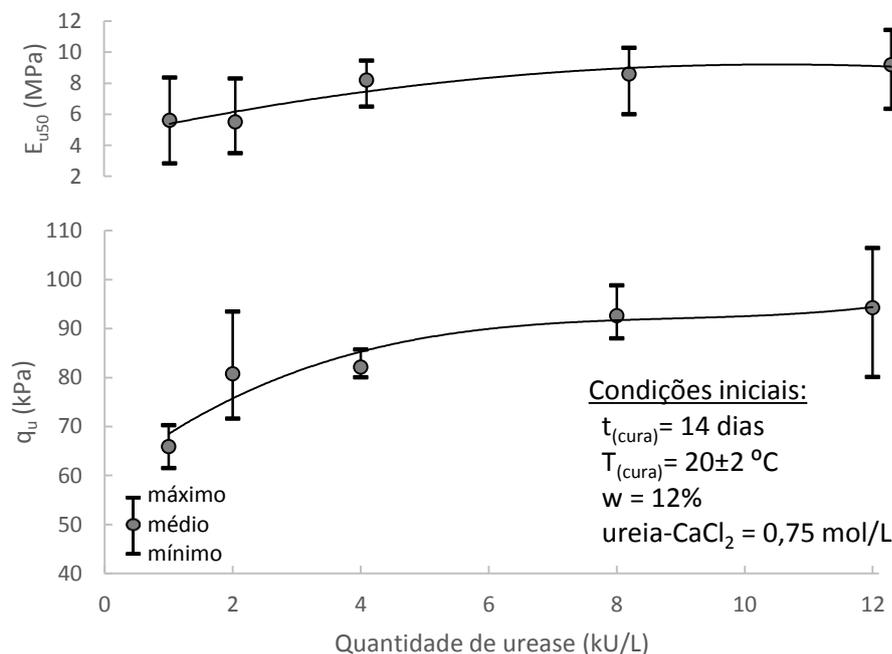


Figura 5.18 – Ensaio UCS: Evolução do q_u e do E_{u50} com a quantidade de *urease*.

Obtém-se um patamar aproximadamente horizontal a partir de 8 kU/L, indicando ser a quantidade necessária para otimizar o efeito estabilizador para uma concentração de 0,75 mol/L de reagentes. Esta evolução é semelhante à tendência obtida com uma condição de cura em câmara húmida para dosagens análogas de reagentes e enzima (item 5.3.1).

Nesta situação, os valores de sucção em cada combinação fazem-se sentir de forma semelhante, dado a concentração de ureia- CaCl_2 ser constante, podendo assim concluir-se que a melhoria de q_u e E_{u50} com o aumento da quantidade de *urease* se deve ao processo de bioestabilização, associada à precipitação de CaCO_3 .

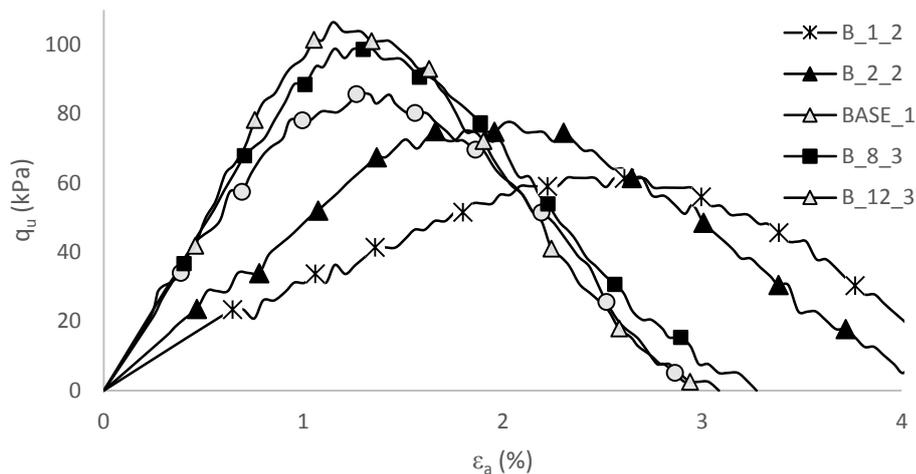


Figura 5.19 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão axial para o subplano B.

5.4.4 Variação do tempo de cura

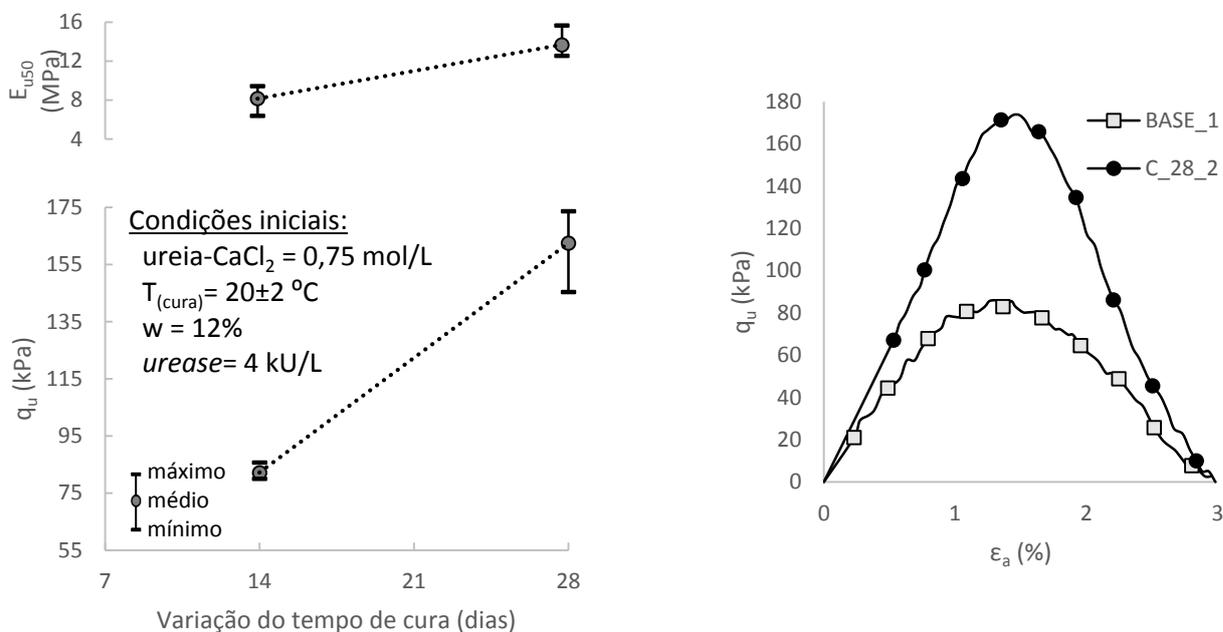


Figura 5.20 – Ensaio UCS: Evolução do tempo de cura: a) evolução de q_u e E_{u50} ; b) curva de tensão-extensão axial.

A análise da influência do tempo de cura (Figura 5.20) mostra que o aumento de 14 para 28 dias origina, nestas condições, a duplicação de q_u e o aumento da rigidez.

Tal como analisado no item 5.4.3, estes resultados vêm demonstrar que o efeito da bioestabilização é eficaz e acontece nas condições ensaiadas. O nível de sucção é, à partida, semelhante para ambos os tempos de cura, sendo que o incremento das propriedades mecânicas observado se pode atribuir maioritariamente ao processo de bioestabilização.

Na Figura 5.21 observa-se uma imagem microscópica SEM, de uma amostra do provete C_28_2, que demonstra, à partida, a presença de carbonato de cálcio em redor das partículas. Estes cristais formam pontes de ligação entre as partículas de solo, levando ao aumento de resistência e rigidez do solo estabilizado.

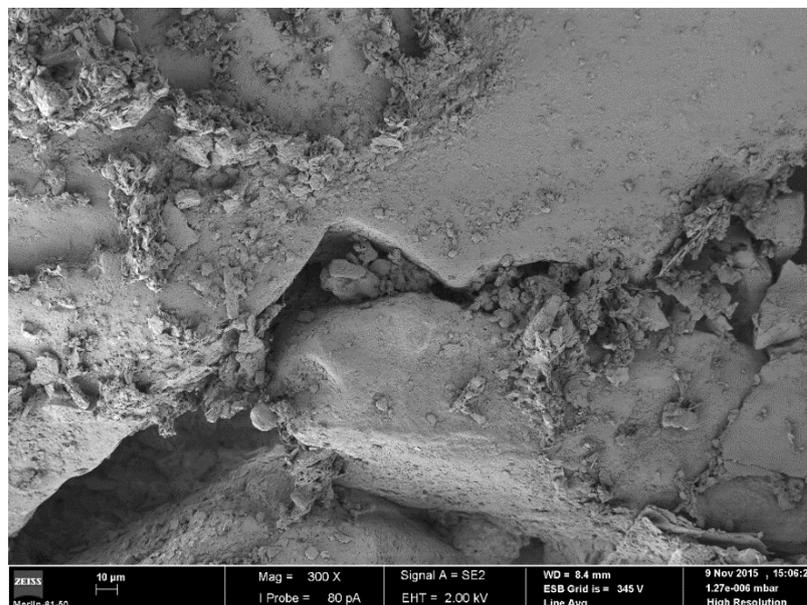


Figura 5.21 – Imagem SEM do solo estabilizado para 28 dias de cura (provete C_28_2)

Com o microscópio eletrónico de varrimento foi possível obter análises químicas (Figura 5.22) da amostra C_28_2. Como se pode observar, as análises 1, 3 e 4 detetam a presença de cálcio, carbono e oxigénio, indicando a presença de CaCO_3 , embora em quantidades reduzidas. As análises 2 e 5 não detetam os constituintes do precipitado, sendo que são referentes às partículas que constituem o corpo terroso.

É ainda importante referir que os ensaios SEM, bem como os ensaios XRD, dão informações qualitativas e não quantitativas, pelo que, numa abordagem futura, seria útil proceder à quantificação de CaCO_3 nos provetes de solo após a realização dos ensaios UCS, de maneira a complementar os resultados.

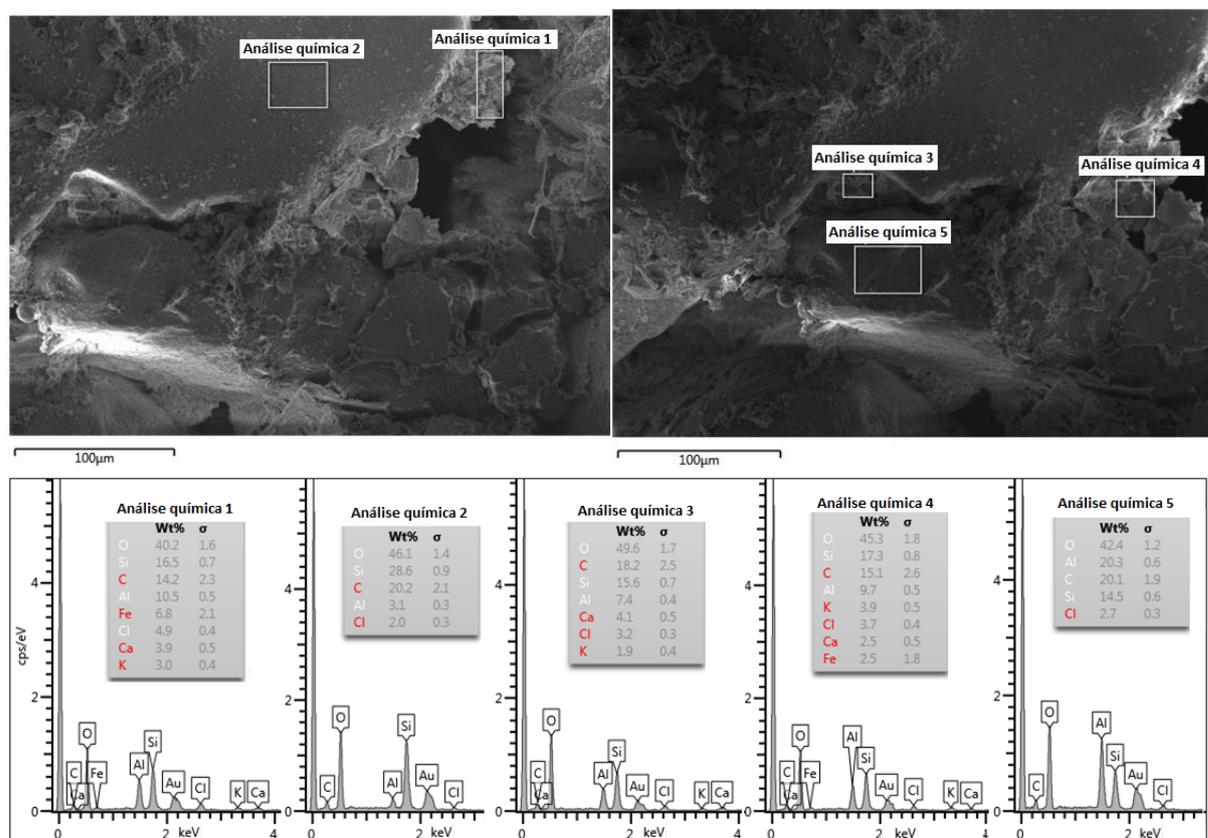


Figura 5.22 – Imagens SEM e análises químicas do solo estabilizado para 28 dias de cura (provetes C_28_2)

5.5 Provetes sujeitos a percolação ascendente

Nesta secção são analisados os resultados de ensaios UCS em provetes sujeitos a percolação, submetidos a condições de cura em câmara húmida e em ambiente (como descritas em 4.6.3).

5.5.1 Condição de cura em câmara húmida

Os provetes submetidos a bioestabilização por percolação em câmara húmida (Quadro 5.2) demonstraram, ao contrário do que seria de esperar, um ganho reduzido e disperso das propriedades mecânicas, quando comparados com os provetes percolados com água (sem solução estabilizadora).

Relativamente ao q_u , verifica-se que o provete P_0,75_12_1 não obteve melhoria significativa, enquanto o provete P_0,75_12_2 melhorou em 50%, relativamente ao anterior. Quanto ao E_{u50} dos provetes bioestabilizados, denota-se um crescimento de 100% face aos provetes não estabilizados.

Quadro 5.2 – Resumo de ensaio UCS para o subplano de percolação.

Plano	Provete	w _{final} (%)	q _u ^{máx} (kPa)	E _{u50} (MPa)	pH
SE_0_0	SE_0_0_1	14,3	23,1	0,8	8,4
	SE_0_0_2	15,2	20,5	0,7	
P_0,75_12	P_0,75_12_1	13,3	20,7	1,3	7,4
	P_0,75_12_2	13,7	30,8	1,4	7,4

Na Figura 5.23 observam-se as curvas tensão-extensão axial do presente subplano de ensaios, em que se regista o aumento do q_u do provete P_0,75_12_2, bem como do módulo de deformabilidade dos provetes bioestabilizados.

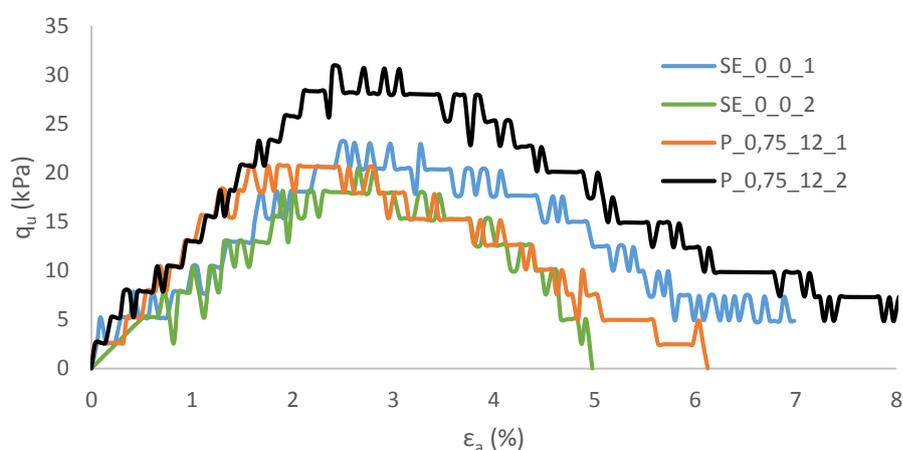


Figura 5.23 – Ensaio UCS: Curva tensão-extensão axial para os provetes submetidos a percolação.

Uma possível explicação do reduzido aumento de resistência dos provetes bioestabilizados remete para que a percolação ascendente possa induzir uma distribuição não uniforme da solução estabilizadora ao longo do provete. Esta assimetria, já referida na bibliografia (Whiffin *et al.*, 2007; DeJong *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2015), pode originar uma distribuição heterogénea de CaCO₃, repercutindo na dispersão dos valores da resistência mecânica do material. Também o tempo de percolação, de 15 minutos, provavelmente não garante um preenchimento equilibrado dos vazios do solo, influenciando os resultados finais.

Outra possível explicação para este comportamento é a formação de um precipitado sobrenadante que não cria ou retarda as ligações rígidas entra as partículas.

Quando se procedeu à percolação, o fluído sobranante (de maneira a verificar a reprodutibilidade de CaCO₃) foi colocado em tubos de ensaio (tubos 3 e 4 da Figura 5.24). Na Figura 5.24 a) observam-se que os tubos 3 e 4 apresentam um precipitado sobrenadante, quando comparado com o CaCO₃ precipitado nos tubos 1 e 2 (preparados 2 meses antes dos restantes). Quando os

tubos são agitados (Figura 5.24 b)) o CaCO_3 dos primeiros permanecem inalterados como uma “pedra”, enquanto nos tubos 3 e 4 se dispersa na solução em forma de “flocos”.

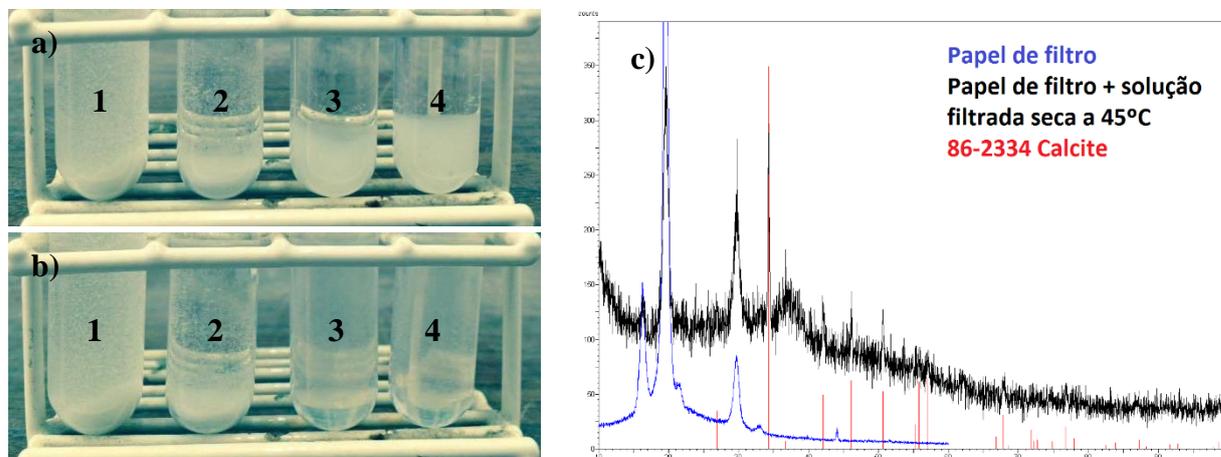


Figura 5.24 – a) Tubos de ensaio com precipitação de CaCO_3 b) Tubos de ensaio com precipitação de CaCO_3 após agitar c) Ensaio XRD para amostra de CaCO_3 sobrenadante.

A Figura 5.24 c) remete para uma análise com ensaio XRD dos tubos 3 e 4. Para tal a solução foi filtrada num papel de filtro e seca a 45°C em estufa. A análise comprovou que o material sobrenadante contém CaCO_3 sobre a forma de calcite.

A precipitação parece não ocorrer sempre da mesma forma, por vezes existe a formação de uma “pedra” enquanto noutras vezes se constata a formação de “flocos” de calcite. Naturalmente, o efeito em termos de melhoria das características do solo bioestabilizado não é indiferente a este processo.

É de notar que o provete P_0,75_12_2 revelou um aumento de resistência, embora reduzido, onde possivelmente parte da solução sobrenadante se tenha tornado rígida no meio poroso, permitindo a ligação das partículas. Repare-se que estes valores correspondem a 14 dias de cura, onde o prolongamento do tempo de cura poderá levar ao endurecimento dos cristais e formação de novas ligações entre partículas e consequente aumento da resistência mecânica.

A formação dos cristais de calcite suspensos (“flocos”) em solução pode ser influenciada pela variabilidade da potência da enzima *urease*, visto que se trata de um material biológico, ou mesmo pelo facto da enzima ter desnaturado, i.e. redução/perda de atividade, quando adicionada à solução de ureia- CaCl_2 . Pode ainda estar relacionado com outros fatores como o pH, a temperatura da solução, a temperatura e humidade do meio envolvente, a incidência de luz, a velocidade com que os reagentes são misturados ou a presença de contaminantes nas soluções.

Para isolar estas questões, seria necessário conduzir um estudo com a variação dos referidos parâmetros, de maneira a perceber a sua dependência e influência no processo químico e quais as razões que levam à formação de um precipitado nestas condições.

Neste trabalho o lote de enzimas utilizado para o estudo da precipitação de CaCO_3 em tubos de ensaio, com uma atividade de 16 kU/g, demonstrou ser mais eficiente relativamente ao lote utilizado na bioestabilização do solo, que continha uma atividade de 34,31 kU/g. Uma atividade por unidade de peso mais reduzida parece ser mais resistente ao meio das soluções de ureia- CaCl_2 , sendo portanto mais indicada para ensaios na vertente de Engenharia Civil. Anota-se também que poderá ser interessante a medição da atividade quando se procede à mudança de lote, aplicando um fator de correção de massa caso exista variabilidade. Quando se trabalha com materiais derivados de síntese biológica, como a enzima *urease*, a potência destes pode variar bastante, sendo a sua variação superior até a 20% em alguns casos. Quando se trabalha com materiais obtidos por síntese química, como a ureia e o cloreto de cálcio, dado o elevado grau de pureza, normalmente, as variações em termos de doseamento não ultrapassam 1,5%.

5.5.2 Condição de cura em ambiente

Na Figura 5.25 observam-se os resultados dos provetes sujeitos a percolação com soluções estabilizadoras de 0,25 e 0,75 mol/L, onde se varia a quantidade de *urease* em 4, 8 e 12 kU/L.

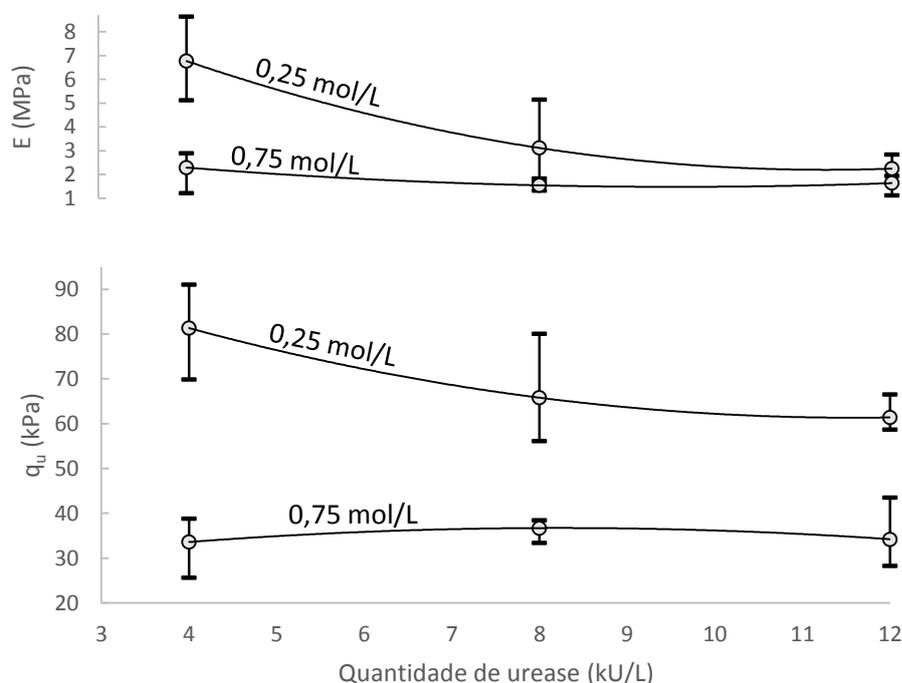


Figura 5.25 – Ensaio UCS: Evolução de q_u e E_{u50} com a quantidade de *urease* nas soluções percoladas com concentração de 0,25 e 0,75 mol/L.

Com o aumento da quantidade de enzima *urease*, seria de esperar que um aumento de resistência (como se verifica na Figura 5.18), contudo, tal não se verifica, revelando uma diminuição das características mecânicas para 0,25 mol/L de ureia- CaCl_2 e uma manutenção para 0,75 mol/L de solução estabilizadora.

A explicação pode residir nos aspetos abordados em 5.5.1, e no facto de, nestes ensaios, se ter utilizado papel de filtro na base do provete no momento da percolação ascendente. À medida que se aumenta a quantidade de *urease*, mais rapidamente se forma CaCO_3 , onde parte dessa formação pode ter ficado retida no papel de filtro, explicando assim a tendência de redução da curva 0,25 mol/L.

É de notar que a cura em ambiente volta a ter outros efeitos na resistência final, como referido em 5.4.1. O teor em humidade dos provetes do presente subplano (Figura 5.26), para o mesmo tempo de cura, é superior para a concentração 0,75 mol/L, sendo aproximadamente o dobro em relação à concentração de 0,25 mol/L.

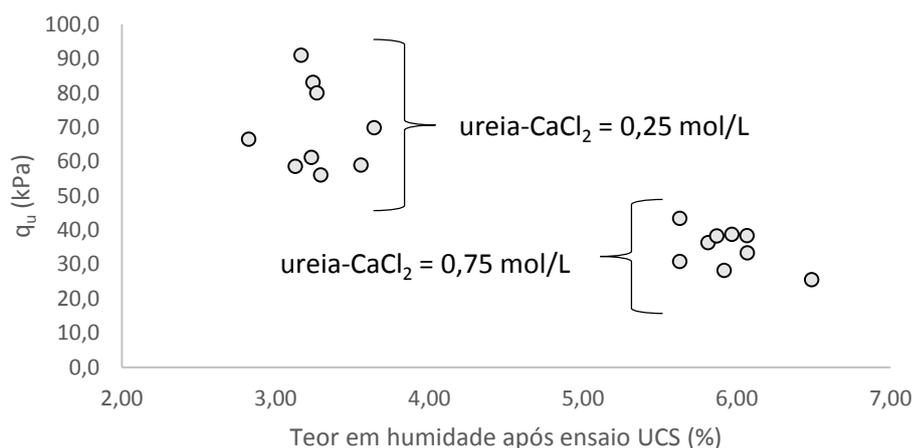


Figura 5.26 – Relação entre o q_u e o teor em humidade após ensaio UCS dos provetes submetidos a percolação.

Julga-se que este facto, na condição de cura em ambiente, está a condicionar os resultados obtidos, levando a que os provetes com menor concentração de ureia- CaCl_2 tenham maior resistência e rigidez. De facto, para uma maior concentração de ureia- CaCl_2 existe maior dificuldade de expulsão de água no provete, sendo os efeitos de sucção mais reduzidos. Assim, os valores de resistência, estando mascarados pelo efeito de sucção, são superiores para menores concentrações de reagentes.

5.6 Comparação com outros trabalhos

Na técnica MICP aplicada ao solo em estudo, por Venda Oliveira *et al.* (2015), Figura 2.3 a), o ganho de resistência à compressão não confinada com a bactéria *I.insulisalae* foi de 52% aos

30 dias. Comparativamente, no presente estudo, com a técnica EMCP, para um volume de solução equivalente (aproximadamente 12% do peso seco do solo), os valores obtidos na Figura 5.9 demonstram um ganho na resistência de 92% aos 28 dias. Note-se que os valores mencionados estão dentro da mesma ordem de grandeza.

Relativamente aos ensaios abordados no estado da arte (capítulo 2), cujos resultados estão condensados na Figura 2.14, verificou-se que estes registaram ganhos de resistência muito superiores, relativamente ao presente trabalho, dado que o volume de solução estabilizadora, em relação ao peso volúmico dos respetivos solos, é também significativamente mais elevado. Repare-se que nesses estudos as percentagens de precipitação de CaCO_3 obtidas, relativamente ao peso do solo seco, variam entre 5 e 25%.

No presente estudo, a utilização de 0,75 mol/L de ureia- CaCl_2 num teor em humidade ótimo de 12%, conduz, teoricamente, a uma massa precipitada de CaCO_3 de 0,9% relativamente ao peso seco do solo (visto o CaCO_3 conter uma massa molar de 100,087 g/mol).

Esta massa teórica seria conseguida caso todos os reagentes fossem consumidos no sentido de precipitar a totalidade de carbonato de cálcio. Dado que a taxa de precipitação é dependente da atividade da enzima *urease*, do pH da solução e da disponibilidade de nucleação, i.e., de formação de cristais de CaCO_3 (Hammes *et al.*, 2002), a quantidade de CaCO_3 precipitado relativamente ao peso seco do solo é, à partida, inferior à referida massa teórica, tendo reflexo na magnitude da bioestabilização, ou seja, na melhoria das propriedades mecânicas do solo.

6 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusões

A presente dissertação procurou caracterizar o efeito da bioestabilização por via enzimática de um saibro (areia mal graduada com silte e cascalho), ligeiramente alcalino (pH de 8,4) e com um baixo teor em matéria orgânica (0,34%).

Foi realizado um estudo preliminar da precipitação de CaCO₃ em tubos de ensaio, tendo-se observado que a utilização de elevadas concentrações de ureia-CaCl₂ pode ter um efeito inibidor no desempenho da enzima *urease*.

Tendo em consideração critérios de otimização da concentração da solução/enzimas, nos testes em tubos de ensaio, estabeleceu-se o ensaio base para a aplicação em provetes de solo: solução aquosa com 0,75 mol/L de ureia-CaCl₂ e 4 kU/L de *urease*, 14 dias de cura e temperatura de cura de 20±2 °C.

O efeito da bioestabilização no solo foi analisado considerando os seguintes fatores: dosagem de *urease*, tempo de cura, concentração equimolar de reagentes ureia-CaCl₂, teor em solução estabilizadora, condições de cura (em câmara húmida ou em ambiente) e tipo de mistura do solo com a solução estabilizadora (mistura manual ou mistura com percolação).

Em relação aos resultados de compactação em câmara húmida, a variação da quantidade de *urease* aponta que 8 kU/L levam a maior resistência à compressão não confinada. Neste caso, os ganhos com maiores dosagens de enzima não traduzem aumentos das propriedades mecânicas, o que sugere que, nestas condições, 8 kU/L otimizam o consumo de reagentes na reação de precipitação.

Ainda na condição de cura em câmara húmida, a variação da quantidade de reagentes sugere que o valor adotado no ensaio base (0,75 mol/L) induz ganhos de resistência superiores. Em relação à variação do tempo de cura, os resultados demonstram um crescimento mais acentuado nos primeiros 7 dias, tendo posteriormente um crescimento mais reduzido com a evolução do tempo de cura. Em relação ao teor em solução denota-se uma melhoria crescente com a quantidade de solução estabilizadora, fruto do aumento de disponibilidade dos reagentes e de enzima *urease* para a precipitação de CaCO₃.

Nas condições de cura em ambiente, os resultados da resistência mecânica dos ensaios UCS revelaram ser superiores, relativamente às condições de cura em câmara húmida. Este facto é

devido à influência dos fenómenos de sucção que, na maioria dos subplanos de ensaios, mascararam os ganhos efetivos de resistência devidos à bioestabilização. Relativamente à quantidade de enzima *urease*, tal como em câmara húmida, os resultados revelam que a quantidade de 8kU/L permite otimizar os valores de resistência.

No caso dos provetes submetidos as percolações identificaram-se obstáculos na precipitação de CaCO_3 , inerentes à metodologia adotada e devida à formação de um precipitado suspenso (Figura 5.24) que pode não criar ligações suficientemente resistentes entre as partículas de solo, condicionando a resistência deste.

Os ensaios SEM e XRD realizados nas amostras de solo bioestabilizadas identificam, embora em quantidades reduzidas, a presença de CaCO_3 , ou seja, confirmam o efeito estabilizador desta técnica.

Comparando o presente estudo com a técnica MICP (utilizando a bactéria *I.insulisalae*) aplicada ao solo em estudo, observa-se que com a utilização de enzimas obteve-se um ganho de resistência à compressão não confinada superior em relação à técnica MICP, embora os valores estejam na mesma ordem de grandeza.

É de notar que o estudo da bioestabilização por via enzimática se trata de um projeto piloto na Universidade de Coimbra. Sendo esta uma técnica de melhoramento de solos relativamente recente e amiga do ambiente, para a tornar competitiva na prática, é essencial cruzar várias conclusões de estudos feitos nesta área, ao selecionar a sua aplicação em campo.

6.2 Propostas para trabalhos futuros

De forma a completar o presente estudo seria relevante considerar os seguintes aspetos:

- Numa abordagem bioquímica, seria importante realizar um estudo abrangente da reação de precipitação de CaCO_3 por via enzimática, fazendo variar, com o intuito de analisar a sua influência e dependência na reação, os seguintes parâmetros: o pH ao longo da reação; a dosagem de *urease*; a concentração molar de ureia; a concentração molar de cloreto de cálcio; a fonte de cálcio; a temperatura; a incidência de luz solar e a humidade relativa.
- Complementar os resultados com a medição do CaCO_3 precipitado no solo, comparando a massa teórica com a massa experimental precipitada. Complementarmente seria interessante comparar a determinação de CaCO_3 por diferentes metodologias (método da decomposição térmica, método da avaliação do volume de CO_2 , etc.).
- Aumentar o volume de solução estabilizadora, bem como as dosagens envolvidas, por forma a garantir resistência mecânicas competitivas, induzindo maiores taxas de precipitado em relação ao peso do solo seco.

- Proceder a diferentes metodologias de mistura, injeção e percolação da solução estabilizadora com o solo.
- Estudar a distribuição espacial de CaCO_3 no solo bioestabilizado.
- Analisar o efeito da extensão do tempo de cura em diferentes condições e com diferentes temperaturas de cura.
- Estender o estudo a diferentes tipos de solos, com granulometrias distintas, diferentes pesos volúmicos e diferentes índices de vazios.
- Estudar a influência da matéria orgânica na bioestabilização por via enzimática;
- Realização de ensaios de corte diametral, de corte direto e ensaios triaxiais.
- Estudar a influência da EMCP na porosidade e permeabilidade de solos.
- Estudar possíveis combinações com outras técnicas de melhoramento de solos, tais como a incorporação de fibras metálicas ou de polipropileno.
- Aumentar o volume das amostras, com o objetivo de transpor a técnica para o campo.
- Estudar a mitigação dos impactes ambientais associados aos subprodutos da reação de precipitação de CaCO_3 por via enzimática.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Qabany, A., and Soga, K. (2013). “Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils”. *Géotechnique*, 63(4), 331–339.
- Al-Thawadi, S.M. (2011). “Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand.” *J. Adv. Sci. Eng. Res.*, 1(1), 98–114.
- Al-Thawadi, S.M. (2008). “High Strength In-Situ Biocementation of Soil by Calcite Precipitating Locally Isolated Ureolytic Bacteria”. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Murdoch University, Western Australia.
- ASTM D 2166 (2000). “Standard test method for unconfined compressive strength of cohesive soil”. American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 2487 (1998). “Standard classification of soils for engineering purposes (Unified Soil Classification System)”. American Society for Testing and Materials.
- Bazylnski, Dennis A., Frankel, Richard B. (2003). “Biologically Controlled Mineralization in Prokaryotes: reviews in Mineralogy and Geochemistry”. v. 54, p. 217-247.
- Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Miletti, S., Ciurl i, S. and Mangani, S. (1999). “A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels”. *Structure* 7, No. 2, 205-2 16.
- Blakely, R.L. and Zerner, B., 1984. “Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme”. *Journal of Molecular Catalysis* 23, 263–292.
- BS 1377-3 (1990). “Methods of test for soils for civil engineering purposes – part 3: chemical and electro-chemical tests”. British Standards Institution, London.
- Bull, A.T., Holt, G., Lilly, M.D. (1982). “Biotechnology International Trends and Perspectives”. Organizations for Economic Co-operation and Development.
- Burbank, M., Weaver, T., Lewis, R., Williams, T., Williams, B., and Crawford, R. (2013). “Geotechnical tests of sands following bioinduced calcite precipitation catalyzed by indigenous bacteria”. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 139(6), 928-936.
- Cardoso, A.S. (1987). “A técnica das pregagens em solos aplicada em escavações – métodos de análise e dimensionamento”. Tese de Doutoramento, FEUP, Porto.
- Chang, R. (2005). “Química”. McGraw-Hill, 8ª edição.

- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R., and Shahin, M.A. (2013). "Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation". *Canadian Geotechnical Journal*, 50(1), 81-90.
- Chou, C.W., Seagren E.A., Aydilek A.H., and Lai, M. (2011). "Biocalcification of sand through ureolysis". *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 137(12), 1179-1189.
- Ciurli, S., Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Miletti, S. and Mangani, S. (1999). "Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms". *Coordination Chem., Rev.* 190-192, 331-355.
- Correia, A.A.S. (2011). "Aplicabilidade da Técnica de Deep Mixing aos Solos Moles do Baixo Mondego". Tese de Doutoramento, Dep. de Eng^a Civil da FCTUC, Universidade de Coimbra.
- Costa, J.N.P. (2012). "Estabilização de solos por via química e biológica". Dissertação de Mestrado, Dep. de Eng^a Civil da FCTUC, Universidade de Coimbra.
- De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W. (2010) "Microbial carbonate precipitation in construction material: A review". *Ecological Engineering*, 36 (2010), 118-136.
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., Verstraete, W. (2008). "Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials." *Cement Concr. Res.*, 38(7), 1005–1014.
- DeJong, J.T., Fritzges, M., and Nüsslein, K. (2006). "Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear". *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 132(11), 1381–1392.
- DeJong, J.T., Mortensen, B. M., Martinez, B.C., and Nelson D.C. (2010). "Bio-mediated soil improvement". *Ecological Engineering*, 36, 196-210.
- DeJong, J.T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., van Paassen, L.A., Al Qabany, A., Aydilek, A., Bang, S.S., Burbank, M., Caslake, L.F., Chen, C.Y., Cheng, X., Chu, J., Ciurli, S., Esnault-Filet, A., Fauriel, S., Hamdan, N., Hata, T., Inagaki, Y., Jefferis, S., Kuo, M., Laloui, L., Larrahondo, J., Manning, D.A.C., Martinez, B., Montoya, B.M., Nelson, D. C., Palomino, A., Renforth, P., Santamarina, J.C., Seagren, E.A., Tanyu, B., Tsesarsky, M., Weaver, T. (2013) "Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, oportunities and challenges". *Géotechnique* 63, No. 4, 287-301.
- E196 (1966). "Solos – Análise granulométrica". Especificação do LNEC, Lisboa, Portugal.
- Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S., and Smith, R.W. (2000). "Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bactéria". *Geomicrobiology Journal*, 17, 305- 318.
- Hamdan N., Kavazanjian J.E., O'Donnell, S. (2013) "Carbonate Cementation via Plant Derived Urease". *Proceeding of the 18th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering, Paris, France.*

- Hammes, F., and Verstraete, W. (2002). "Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation". *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 1(1), 3–7.
- Hammes, F., Boon, N., Villiers, J., Verstraete, W., Siliciliano, S.D. (2003) "Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation". *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4901-4909.
- Harkes, M., van Paassen, L.A., Booster, J.L., Whiffin, V.S. and van Loosdrecht, M.C.M. (2010). "Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement". *Ecological Engineering*, 36, 112-117.
- Head, K.H. (1982). "Manual of Soil Laboratory Testing, Volume 2: Permeability, Shear Strength and Compressibility Tests". Pentech Press Limited. Plymouth, London.
- Ismail, M.A., Joer, H.A., Randolph, M.F. and Merit A. (2002). "Cementation of porous materials using calcite". *Géotechnique*, 52(5), 313–324
- Karatas, I., Kavazanjian, E. and Rittmann, B.E. (2008). "Microbially induced precipitation of calcite using *Pseudomonas denitrificans*". *Proceedings of 1st International Conference on Bio-Geo_Civil Engineering*, Delft, Netherlands, pp. 58-66.
- Lee, Y. N. (2003). "Calcite Production by *Bacillus amyloliquefacies* CMB01". *Journal of Microbiology*, 41 (4), 345-348.
- Lowenstan, H.A., Weiner, S. (1988). "On Biomineralization". Oxford University Press, New York.
- Marzadori, C., Miletto, S., Gessa, C. and Ciurli, S., (1998). "Immobilization of jack bean urease on hydroxyapatite: urease immobilization in alkaline soils". *Soil Biol. & Biochem.* 30 (12), 1485-1490.
- Mitchell, J. K., Santamarina, J. C. (2005). "Biological considerations in geotechnical engineering". *ASCE J. Geotech. Geoenviron. Engng* 131, No. 10, 1222-1233.
- Nemati, M., & Voordouw, G. (2003). "Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ". *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 635-642.
- Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., and Unno, T. (2013). "Applicability of enzymatic calcium carbonate precipitation as a soil-strengthening technique". *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 139(12), 2201-2211.
- Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., and Unno, T. (2015). "Distribution of mineralized carbonate and its quantification method in enzyme mediated calcite precipitation technique". *Soils and Foundations*, 55(2), 447-457.
- NP 143 (1969). "Solos – Determinação dos Limites de Consistência". Norma Portuguesa Definitiva.
- NP 83 (1965). "Solos – Determinação da Densidade das Partículas Sólidas". Norma Portuguesa Definitiva.
- NP EN 12390-1 (2010). "Ensaio do betão endurecido. Parte 1: Forma, dimensões e outros requisitos para o ensaio de provetes e para os moldes". IPQ.

- NP EN 12390-3 (2011). “Ensaio do betão endurecido. Parte 3: Resistência à compressão de provetes”. IPQ.
- Pettit N. M., Smith A. R. J., Freedman R. B. and Burns R. G., 1976. “Soil urease: activity, stability, and kinetic properties”. *Soil Biol. & Biochem.* 8, 479-484.
- Roden, E. E., Leonardo, M. R. & Ferris, F. G. (2002). “Immobilization of strontium during iron biomineralization coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction”. *Geochim. Cosmochim.*, 66, No. 16, 2823-2839
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., & Bang, S.S. (1999). “Microbiological precipitation of CaCO₃”. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (11), 1563-1571.
- Sumner, J. B. (1926). “The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease”. *Journal of Biological Chemistry*, 69, 435-441.
- Tiano, P., Biagiotti, L., & Mastromei, G. (1999). “Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: Methods of evaluation”. *Journal of Microbiological Methods*, 36, 139-145.
- Toll, D.G. (1990). “Triax - user manual”. Geotechnical Systems Group, School of Engineering and Computer Science, University of Durham, UK.
- Van Paassen, L. A., (2009). “Biogrout. Ground Improvement by Microbially Induced Carbonate Precipitation”. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Delft University of Technology, Netherlands.
- Van Paassen, L.A., Ghose, R., van der Linden, T.J.M., van der Star, W.R.L., and van Loosdrecht, M.C.M. (2010a). “Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogrout experiment”. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering (ASCE)*, 136(12), 1721–1728.
- Van Paassen, L.A., Ghose, R., van der Linden, T. J. M., van der Star, W.R.L., and van Loosdrecht, M.C.M. (2010b). “Potential soil reinforcement by biological denitrification”. *Ecological Engineering*, 36, 1721–1728.
- Venda Oliveira, P.J., Costa, M.S., Costa, J.N.P., Nobre, M.F. (2015). “Comparison of the ability of two bacteria to improve the behaviour of a sandy soil. *Journal of Materials in Civil Engineering*”, Vol. 27(1), pp. 06014025. DOI: 10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001138.
- Warthmann, R., van Lith, Y., Vasconcelos, C., McKenzie, J. A. & Karpoff, A. M. (2000). “Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments”. *Geology* 28, No. 12, 1091-1094.
- Weaver, T., Burbank, M., Lewis, R., Lewis, A., Crawford, R. & Williams, B. (2011). “Bio-induced calcite, iron, and manganese precipitation for geotechnical engineering applications”. *Proc. GeoFrontiers 2011: Advances in Geotechnical Engineering*, Dallas, TX, ASCE Geotechnical Special Publication, 2 11, 3975-3983.
- Whiffin, V. S. (2004). “Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement”. PhD Thesis. Murdoch University, Perth, Western Australia.

- Whiffin, V. S., van Paassen, L. A., and Harkes, M. P. (2007). "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique". *Geomicrobiology Journal*, 24 (5), 417-423.
- Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K., Okamura, M. (2012). "Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymetically induced carbonate precipitation". *Soils Found*, 52 (3), 539-549.