

# UTILIZAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA PARA A ESTABILIZAÇÃO DE SOLOS: INFLUÊNCIA DO TIPO DE SOLO

## USE OF BIOTECHNOLOGY FOR SOIL STABILIZATION: EFFECT OF SOIL TYPE

Freitas, Luís D.; *FCTUC, Coimbra, Portugal, ldomfreitas@gmail.com*  
Venda Oliveira, Paulo J.; *FCTUC, Coimbra, Portugal, pjvo@dec.uc.pt*

### RESUMO

Neste artigo apresenta-se uma técnica de estabilização de solos baseada na precipitação de carbonato de cálcio por via enzimática, estudando-se, complementarmente, a influência do tipo de solo na eficiência do processo. Sucintamente, esta técnica consiste na mistura do solo com uma solução aquosa de ureia, cloreto de cálcio e enzima *urease* com concentrações de 4 kU/L e 8 kU/L. Em seguida, o solo é compactado em tubos de PVC de pequenas dimensões sendo a cura realizada em câmara húmida. A avaliação da eficiência desta metodologia é efetuada com base em ensaios de compressão simples (UCS). Os resultados obtidos mostram que a bioestabilização do solo induz uma melhoria significativa da resistência e da rigidez em solos bem graduados sem matéria orgânica, tendo um efeito contraproducente em caso de solos orgânicos.

### ABSTRACT

This paper presents a soil stabilization technique through calcium carbonate precipitation by enzymatic action and studies the effect of the soil type on this process. With this technique an aqueous solution of urea, calcium chloride and *urease* enzyme (with concentrations of 4 and 8 kU/L) is mixed with the soil. After that, the soil is compacted in PVC tubes of small dimensions and the cure is performed in a wet chamber. To evaluate of the efficiency of biostabilised soils UCS tests are carried out. The results show a significant improvement of strength and stiffness when a well-graded soil without organic matter is biostabilised. On the contrary, the biostabilisation technique has a negative effect on organic soils.

### 1 - INTRODUÇÃO

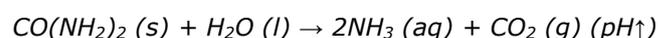
Quando os solos de fundação de diversas infraestruturas não são os mais recomendáveis do ponto de vista geotécnico, é necessário proceder à estabilização destes solos de modo a promover a melhoria das suas propriedades mecânicas, nomeadamente resistência e rigidez. A geotecnia, frequentemente, recorre a métodos químicos, através da adição de ligantes (cimento, cal, escórias, cinzas volantes, etc.), para melhorar as características mecânicas destes solos. Contudo, aliando-se a crescente consciencialização ambiental, com a procura de técnicas sustentáveis e mais económicas, nos últimos anos tem-se procurado desenvolver várias técnicas alternativas, algumas das quais baseadas na biotecnologia.

A biotecnologia compreende toda a aplicação de seres vivos, ou parte deles, para a produção de bens e serviços. Recentemente, têm-se realizado diversos trabalhos de investigação no sentido de se estudarem soluções do âmbito da biotecnologia para a estabilização de solos, técnicas estas mais "amigas do ambiente", dado que promovem a união entre as partículas do solo através de um cimento de origem biológica (biocalcificação), ao invés de se usarem produtos químicos (estabilização química).

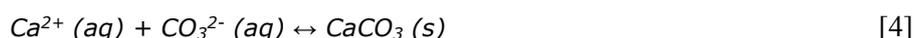
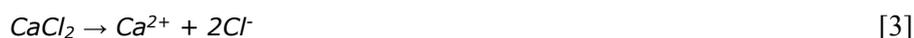
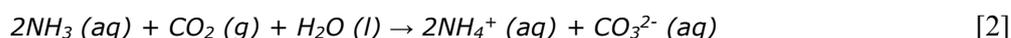
A biocalcificação consiste na precipitação de minerais devido à atividade celular de um ser vivo. Na natureza, podemos observar este fenómeno na formação de conchas, que são compostas por 95-99% de carbonato de cálcio. Na engenharia existe um crescente interesse por este tipo de processos, recorrendo-se à utilização de seres vivos secretores de compostos cristalinos. A título de exemplo, estes compostos podem ser aplicados na proteção de superfícies de pedra e de betão (Muñeton, 2009).

De acordo com Gómez (2006), a biocalcificação no âmbito da engenharia civil pode ser aplicada através de várias metodologias: bio-obturação, biorremediação e bioestabilização, correspondendo esta última à temática elaborada no presente trabalho. A bioestabilização promove a melhoria das propriedades geotécnicas dos solos através da precipitação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), através de processos biológicos.

O processo de bioestabilização é descrito através das seguintes equações:



[1]



Em geral, o processo de biocalcificação é potenciado devido à importante ação da enzima *urease* que promove a degradação da ureia, ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) em amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) aumentando o pH da solução, Eq. [1]. Em seguida, o amoníaco e o dióxido de carbono reagem e dão origem aos iões amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) e carbonato, ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) Eq. [2]. Ao adicionar a quantidade adequada de iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), através da introdução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), Eq. [3], é produzido instantaneamente carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), Eq. [4].

Existem duas vias para fornecer a enzima *urease* necessária para degradar a ureia, a primeira, estudada por Costa (2012), consiste no cultivo de bactérias que produzem a enzima *urease*, enquanto a segunda via passa pela introdução direta desta enzima no solo. Apenas a última via será abordada neste trabalho, dado a utilização direta de enzimas ser um processo mais simples e vantajoso que a utilização de bactérias, pois o cultivo de bactérias exige determinadas condições ambientais difíceis de implementar *in-situ* (Yasuhara *et al.*, 2012). A Figura 1 representa esquematicamente o processo descrito.

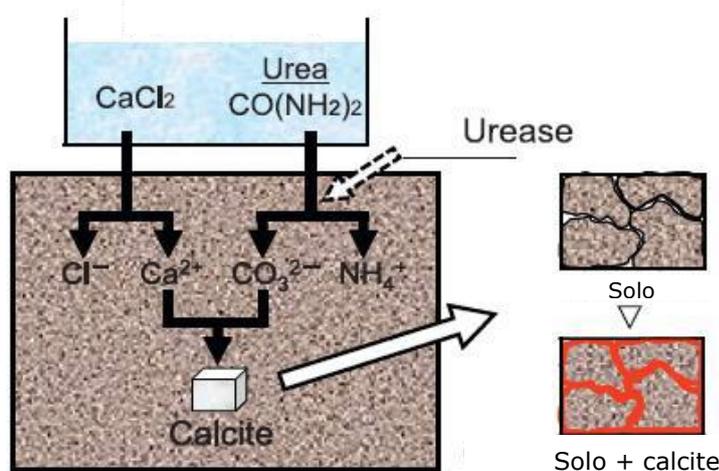


Figura 1 – Esquema do processo da precipitação de carbonato de cálcio por via enzimática (Adaptado de Yasuhara *et al.*, 2012)

Nemati e Voordouw (2003) utilizando a técnica de precipitação de carbonato de cálcio por via enzimática, concentraram o seu estudo no efeito sobre a variação da permeabilidade em meios porosos, tendo mostrado que a formação de  $\text{CaCO}_3$  depende da concentração de enzima *urease* e dos reagentes, ureia e cloreto de cálcio, assim como da temperatura. O aumento da concentração de enzimas levou a um aumento da velocidade de produção de  $\text{CaCO}_3$  enquanto o aumento da concentração dos reagentes incrementou a quantidade de  $\text{CaCO}_3$  produzida. Os ensaios realizados em meios porosos não consolidados indicaram que um aumento da concentração de *urease* e reagentes traduz-se numa significativa redução da permeabilidade do meio. Com o aumento da temperatura, de  $20^\circ\text{C}$  para  $50^\circ\text{C}$ , observou-se uma melhor distribuição de  $\text{CaCO}_3$  em todo o provete. Nemati *et al.* (2003) também concluíram que a formação de  $\text{CaCO}_3$ , *in situ*, por via enzimática aparenta ser um método muito eficiente na redução da permeabilidade de um meio poroso, pelo que esta técnica poderá ser aplicada na consolidação de areias, na captura de isótopos radioativos e na identificação de elementos contaminantes em sistemas de águas subterrâneas.

Yasuhara *et al.* (2012) realizaram ensaios UCS e de permeabilidade para observar a evolução das propriedades mecânicas e hidráulicas do solo, tendo constatado melhorias drásticas na resistência à compressão dos solos bioestabilizados, com aumentos de 400 kPa até 1.6 MPa. Também observaram uma redução significativa do coeficiente de permeabilidade, tal como observado por Nemati *et al.* (2003).

Neupane *et al.* (2013) analisaram a taxa de precipitação de  $\text{CaCO}_3$  para várias concentrações de reagentes para um valor fixo da concentração da enzima *urease*. Estes autores observaram que uma pequena quantidade de enzima leva a um significativo aumento da precipitação de carbonato de cálcio, tendo estes autores concluído que esta técnica é indicada para o reforço de solos.

Os estudos realizados acerca da estabilização de solos através da precipitação de carbonato de cálcio por via enzimática têm incidido sobretudo em solos arenosos. Como tal, o presente trabalho vem complementar

e aprofundar os conhecimentos sobre esta técnica, estudando-se o efeito da concentração de *urease* e do tipo de solo na eficiência do processo de bioestabilização, com base em resultados de ensaios UCS.

## 2 - CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAIS

### 2.1 - Solos em estudo

Na execução da análise laboratorial foram utilizados três solos diferentes. Um dos solos, denominado por S75/A25, foi criado artificialmente resultando da mistura de uma areia com um silte arenoso numa proporção de 75%/25%, respetivamente. Os restantes solos analisados são solos naturais e consistem num silte arenoso e num silte argiloso com matéria orgânica (11%), sendo denominados ao longo do trabalho por Silte e Solo Mole, respetivamente. A Figura 2 e o Quadro 1 apresentam a granulometria e as principais características dos solos referidos.

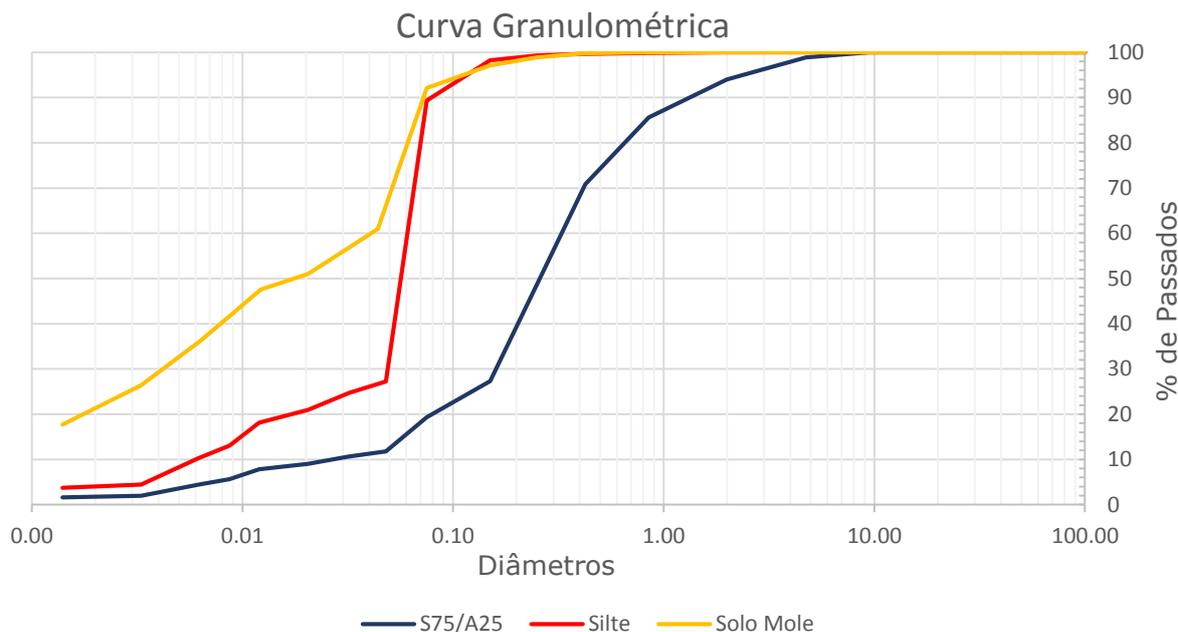


Figura 2 – Curvas granulométricas dos solos em estudo.

Quadro 1 – Caracterização geotécnica dos solos em estudo

| Solos     | Limites de consistência |                    | G    | W <sub>opt</sub> (%) | Y <sub>dmax</sub> (kN/m <sup>3</sup> ) | OM (%) | pH   |
|-----------|-------------------------|--------------------|------|----------------------|--|--------|------|
|           | W <sub>P</sub> (%)      | W <sub>L</sub> (%) |      |                      |  |        |      |
| S75/A25   | -                       | -                  | 2.68 | 8.93                 | 19.18                                  | -      | 8.19 |
| Silte     | -                       | -                  | 2.78 | 14.88                | 17.13                                  | -      | 7.06 |
| Solo Mole | 38.4                    | 48.5               | 2.64 | 32.88                | 13.35                                  | 11     | 4.49 |

### 2.2 - Reagentes e enzima *urease*

Os reagentes utilizados na preparação das soluções aquosas são o cloreto de cálcio e a ureia. O cloreto de cálcio encontra-se na forma sólida e tem uma massa molar de 110.99 g/mol. A ureia apresenta uma pureza de 99.5%, encontra-se na forma sólida e possui uma massa molar de 60.06 g/mol.

A hidrólise da ureia é catalisada através da enzima *urease*. Esta proteína é denominada por *urease* de tipo III, extraída das sementes da planta *Canavalia ensiformis*, comumente chamada de “feijão-de-porco”. Para que o seu efeito seja otimizado, o pH do meio em que é inserida deve ser de 7.4, ou seja, quase neutro, (Cesareo e Langton, 1992). Deve armazenar-se em ambiente seco entre 2 a 8 °C para que a sua capacidade catalisadora não seja comprometida. A sua atividade específica é 15000-50000 unidades por grama sólida. Uma unidade irá libertar 1.0 μmole de NH<sub>3</sub> a partir da ureia por minuto a uma temperatura de 25 °C e um pH de 7.0.

O Quadro 2 apresenta as quantidades calculadas para 570g de solo, o qual permite a preparação de 3 provetes para cada tipo de análise.

Quadro 2 – Quantidade de ureia, cloreto de cálcio e de *urease* (preparação de 570g de solo)

| Solos     | Concentração de <i>urease</i> |               |                       |                           |               |                       | $w_{opt}$ (*)<br>(%) | Vol <sub>H<sub>2</sub>O</sub><br>(mL) |
|-----------|-------------------------------|---------------|-----------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------------|
|           | 4 kU/L                        |               |                       | 8 kU/L                    |               |                       |                      |                                       |
|           | CaCl <sub>2</sub><br>(gr)     | Ureia<br>(gr) | <i>Urease</i><br>(gr) | CaCl <sub>2</sub><br>(gr) | Ureia<br>(gr) | <i>Urease</i><br>(gr) |                      |                                       |
| S75/A25   | 1.423                         | 0.770         | 0.0060                | 2.847                     | 1.541         | 0.0119                | 9.0                  | 51.3                                  |
| Silte     | 2.372                         | 1.284         | 0.0099                | 4.745                     | 2.568         | 0.0198                | 15.0                 | 85.5                                  |
| Solo Mole | 5.219                         | 2.824         | 0.0218                | 10.439                    | 5.649         | 0.0436                | 33.0                 | 188.1                                 |

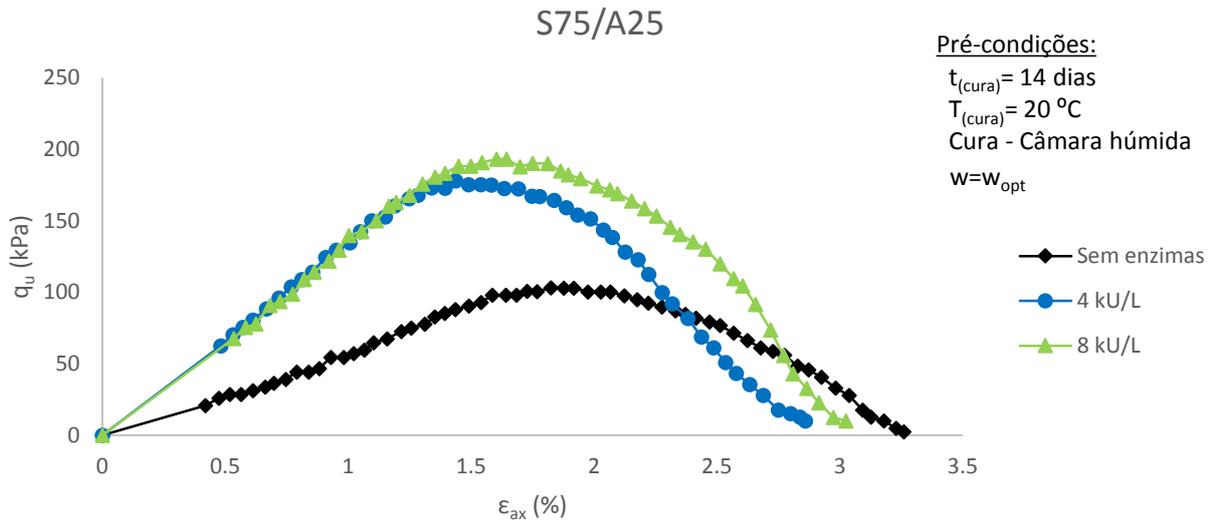
(\*) Obtido do ensaio Proctor Normal

### 3 - PROCEDIMENTO LABORATORIAL DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

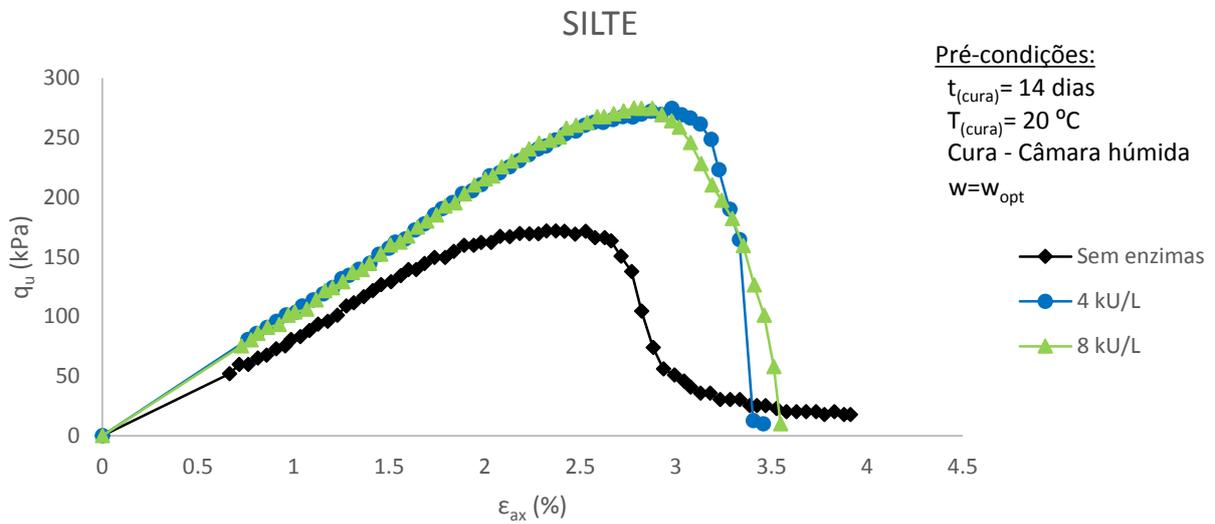
Este trabalho tem como base a análise dos resultados provenientes de ensaios UCS efetuados com provetes cilíndricos com 37 mm de diâmetro e 76 mm de altura. O procedimento dos ensaios realizados é descrito nos seguintes itens:

- i) Preparação da solução aquosa de cloreto de cálcio, ureia e de enzima *urease* de acordo com as quantidades apresentadas no Quadro 2. Divide-se a quantidade de água por dois recipientes, o primeiro com a solução de cloreto de cálcio e ureia e o segundo com a solução da enzima. Após a dissolução total dos reagentes, adiciona-se a solução com a enzima.
- ii) Após a pesagem de 570g de solo, adiciona-se a solução aquosa ao solo e mistura-se até este apresentar um aspeto homogéneo, ou seja, até a água se distribuir uniformemente por toda a amostra de solo.
- iii) Compactação das amostras num tubo de PVC para o teor em água ótimo ( $w_{opt}$ ) do ensaio Proctor Normal de modo a garantir o peso volúmico seco máximo ( $\gamma_{dmax}$ ).
- iv) A amostra é colocada numa câmara húmida, com teor em humidade ( $97\pm 3\%$ ) e temperatura ( $20\pm 2$  °C) controlados durante 14 dias de cura.
- v) Terminado o tempo de cura as amostras são submetidas a ensaios de compressão simples (UCS). Cada amostra é extraída dos tubos de PVC com o auxílio de um macaco hidráulico, sendo posteriormente colocada na prensa, de modo a limitar eventuais variações do teor em água. Centra-se a amostra de modo a que a célula de carga actue o mais próximo possível do centro geométrico do seu topo circular.
- vi) Após a colocação da amostra de solo na prensa, aproxima-se a amostra o mais possível da célula de carga e coloca-se a zero o valor medido pelo transdutor de deslocamento e o valor medido pela célula de carga.
- vii) Executa-se o ensaio UCS com uma velocidade de corte de 1%/min (0.760mm/min), enquadrando-se nos valores recomendados, ou seja, entre 0.5% e 2%/min. Os valores de carga e deslocamento são registados num computador através de software adequado (TRIAX).
- viii) O ensaio termina quando, após se atingir o valor de carga máxima do provete ( $q_{umax}$ ), o valor medido pela célula de carga atinge um valor insignificante em relação ao máximo.
- ix) Terminado o ensaio, gravam-se os dados obtidos e fotografa-se o provete para futura análise da rotura.
- x) No final, remove-se o provete da prensa cuidadosamente e avalia-se o teor em água.

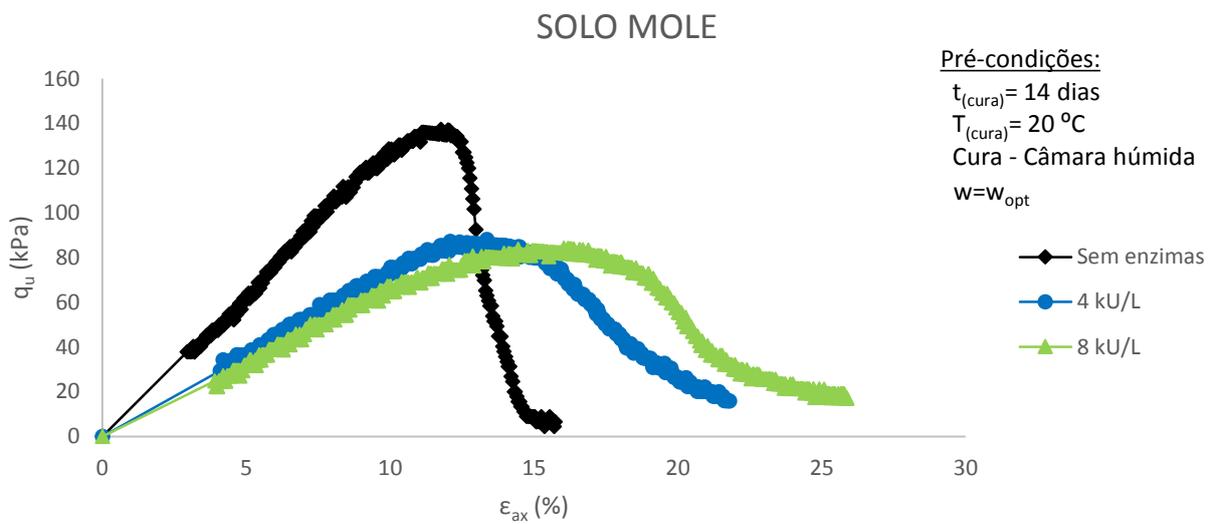
De modo a garantir a fiabilidade dos resultados, para cada tipo de parâmetro em estudo, foram ensaiados três provetes.



a)



b)



c)

Figura 3 – Gráficos tensão-extensão ( $q_u - \epsilon_{ax}$ ) correspondentes a ensaios UCS de provetes de:  
 a) S75/A25; b) Silte; c) Solo Mole

#### 4 - APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS

A Figura 3 apresenta as curvas tensão-extensão axial ( $q_u$ - $\epsilon_{ax}$ ) para diferentes dosagens de *urease* (sem enzimas, 4 kU/L e 8 kU/L) e três tipos de solos. Assim, a Figura 3a refere-se ao solo S75/A25, a Figura 3b ao Silte e a Figura 3c representa o comportamento do Solo Mole. Nos solos S75/A25 e Silte observa-se que a bioestabilização não altera de forma significativa o comportamento qualitativo do solo, mantendo-se similar ao solo base, isto é, com uma descida suave da resistência pós-rotura. Em termos gerais, constata-se a bioestabilização promove a melhoria do comportamento mecânico dos solos S75/A25 e Silte, enquanto o efeito da bioestabilização no solo mole é contraproducente.

De modo a evidenciar as principais características dos diversos provetes ensaiados, nas Figura 4 e 5 apresentam-se as variações da tensão de rotura máxima ( $q_u$ ) e do módulo de deformabilidade avaliado para 50% da máxima resistência ( $E_{u50}$ ), em função do tipo de solo e da concentração de *urease*. Em termos gerais, constata-se para a variação do módulo de deformabilidade (Figura 5) uma maior dispersão de resultados que a observada na variação de resistência (Figura 4).

No cômputo geral, constata-se que o efeito da bioestabilização nos solos S75/A25 e Silte origina um significativo aumento resistência e de rigidez, efeito este que tende a aumentar com o incremento da concentração de *urease* (de 4 kU/L para 8 kU/L), sugerindo existir uma maior precipitação de carbonato de cálcio. De facto, o aumento da quantidade de *urease* proporciona o incremento da hidrólise da ureia, criando as condições necessárias para o incremento da massa de  $\text{CaCO}_3$  precipitada.

Em termos do módulo de deformabilidade (Figura 5), constata-se que o solo S75/A25, apresenta o maior incremento de  $E_{u50}$ , em consonância com o registado em termos de tensão máxima de rotura (Figura 4). Quanto ao Silte verificou-se que o incremento da concentração de *urease* de 4 kU/L para 8 kU/L originou a diminuição do módulo de deformabilidade nos provetes bioestabilizados.

Todavia, pela análise da Figuras 3c, 4 e 5, observa-se um pior comportamento nos provetes de Solo Mole bioestabilizados em relação ao solo não estabilizado, tanto em termos de  $q_{u\max}$  como de  $E_{u50}$ . O efeito da variação da concentração de *urease* no Solo Mole é desprezável. Deve-se salientar que a bioestabilização também leva a uma maior deformação axial na rotura. Julga-se que este comportamento está associado à presença de matéria orgânica (11%) que impede a criação de ligações de carbonato de cálcio entre as partículas de solo, aliada ao facto da bioestabilização também provocar o aumento de teor em água, o que contribui para a redução de resistência observada após bioestabilização.

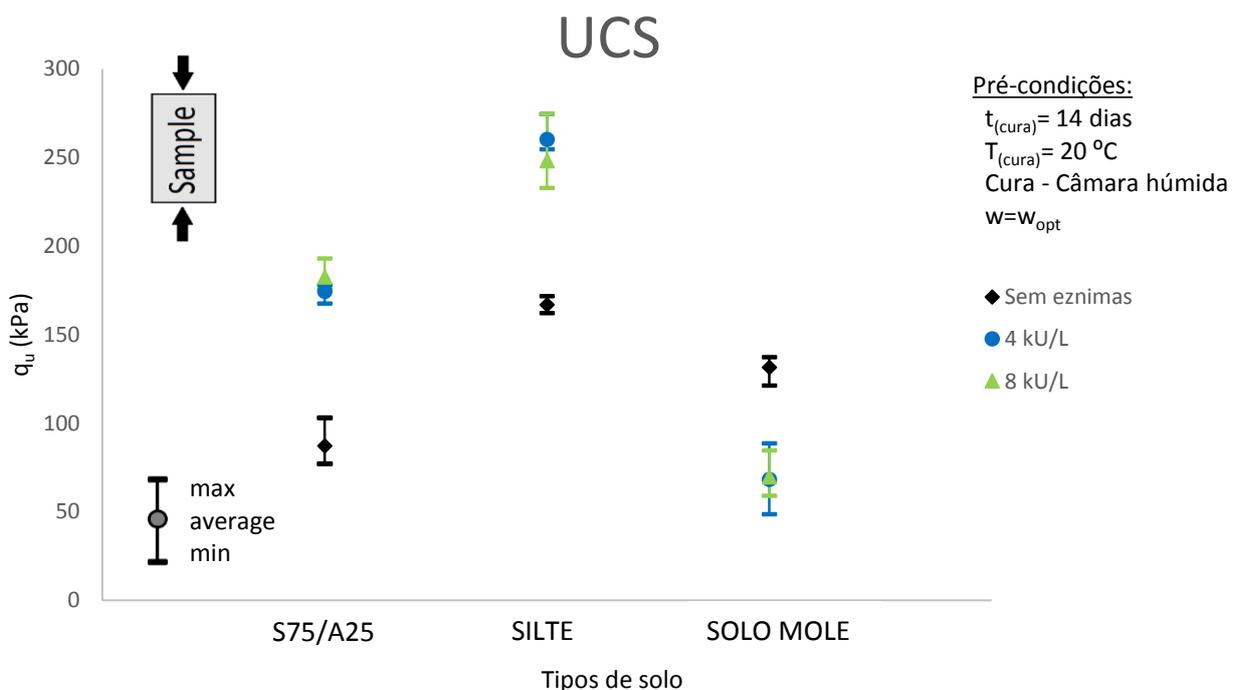


Figura 4 – Valores da tensão máxima de rotura ( $q_{u\max}$ ) obtidos nos ensaios UCS com diferentes concentrações de enzimas e tipos de solos

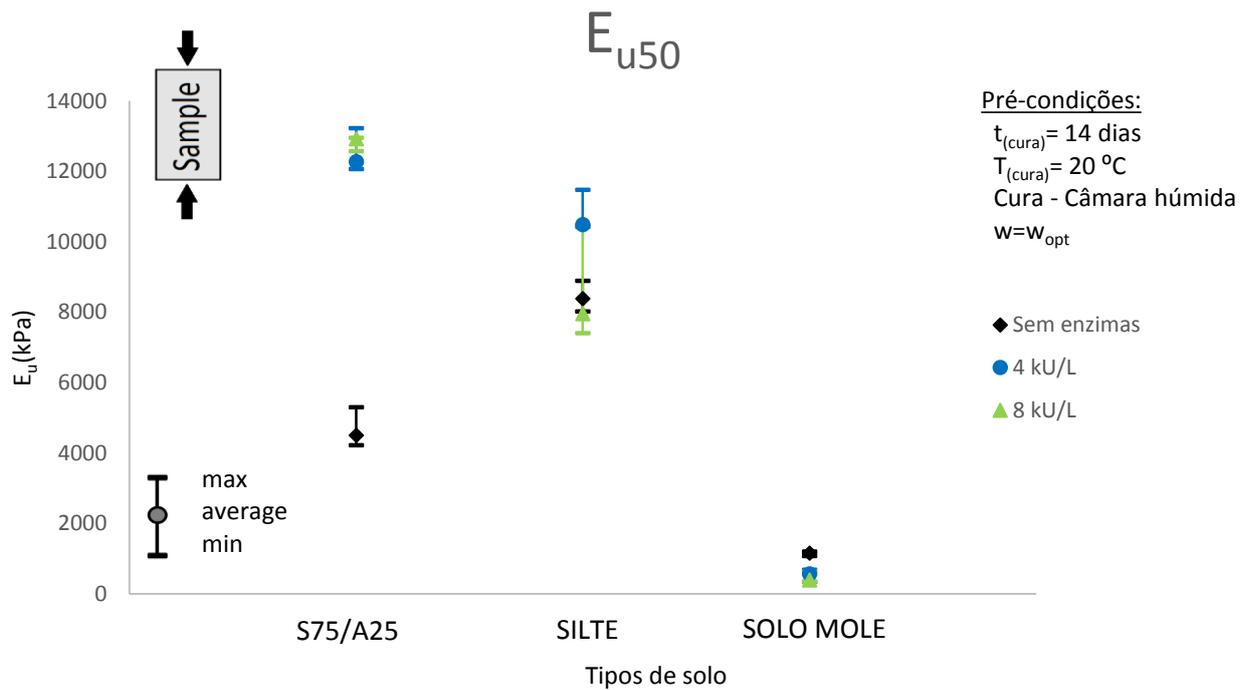


Figura 5 – Valores do módulo de deformabilidade (correspondente a 50% da tensão máxima de rotura) obtidos nos ensaios UCS com diferentes concentrações de enzimas e tipos de solos

O Quadro 3 apresenta os valores de pH avaliados no fim do tempo de cura de cada solo e para as diversas concentrações de *urease*. Em geral, constata-se com o aumento da concentração de urease a diminuição de pH dos solos. Apesar de se terem registado decréscimos no valor de pH no final do tempo de cura, a curto prazo este tende a aumentar, registando-se, posteriormente, com as reações entre os iões amónio e cloreto, a formação de cloreto de amónio,  $NH_4Cl$ , que possui um carácter mais ácido, levando a longo prazo à redução de pH do solo. Desta forma, pode concluir-se que a redução de pH está associada (embora de forma indireta) ao incremento da degradação da ureia, potenciando a precipitação de  $CaCO_3$ .

Os resultados (Quadro 3) também mostram que o Solo Mole apresenta um pH muito baixo, não criando as condições necessárias para a precipitação de  $CaCO_3$ , podendo este facto justificar o efeito contraproducente da bioestabilização neste solo.

| Solos     | Concentração de urease |        |        |
|-----------|------------------------|--------|--------|
|           | Sem Enzimas            | 4 kU/L | 8 kU/L |
| S75/A25   | 8.44                   | 7.67   | 7.61   |
| Silte     | 7.75                   | 7.55   | 7.44   |
| Solo Mole | 4.32                   | 3.93   | 3.77   |

## 5 - CONCLUSÕES

Considerando a análise laboratorial realizada podem retirar-se as seguintes conclusões:

- O processo de precipitação de carbonato de cálcio por via enzimática consegue promover a estabilização de solos não orgânicos, originando o aumento da resistência e da rigidez.
- A bioestabilização quando aplicada a solos orgânicos parece ter um efeito contraproducente, devido provavelmente à forte presença de matéria orgânica, que está associada ao baixo valor de pH, não criando as condições necessárias para a precipitação de carbonato de cálcio.
- O processo de precipitação de carbonato de cálcio provoca um decréscimo nos valores de pH a longo prazo, facto associado a uma maior degradação da ureia, o que potencia a precipitação de  $CaCO_3$ .

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de expressar os seus agradecimentos às instituições que suportaram financeiramente esta investigação: ISISE (UID/ECI/04029/2013) e ACIV.

## **REFERÊNCIAS**

- Cesareo, S.D. e Langton, S.R. (1992). Kinetic properties of *Helicobacter pylori* urease compared with jack bean urease. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 78, pp. 15-21.
- Costa, J.N.P. (2012). Estabilização de solos por via química e biológica. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Freitas, L.D. (2016). Utilização da biotecnologia para a estabilização de solos: precipitação de CaCO<sub>3</sub> por via enzimática. Influência do tipo de solo. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Gómez, E. (2006). Evaluación de las propiedades geotécnicas de suelos arenosos tratados con bacterias calcificantes. Tese de Mestrado, Universidade Nacional da Colômbia, Medellín, Colômbia.
- Muñeton, C. (2009). Uso de biotecnologia na melhoria de solos para fins de pavimentação rodoviária. Dissertação de Mestrado em Geotecnia, Universidade de Brasília, Brasília.
- Nemati, M. e Voordouw, G. (2003). Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 33, pp. 635-642.
- Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., e Unno, T. (2013). Applicability of Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation as a Soil-Strengthening Technique. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering ASCE*, Vol.139, pp. 2201-2211, ASCE.
- Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K. e Okamura, M. (2012). Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, Vol. 52, No. 3, pp. 539-549.