

# PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

Escuela de Posgrado



Aplicación de la enzima ureasa en la estabilización de suelos y la auto-reparación de matrices empleadas en impresión 3D

Tesis para obtener el grado académico de Maestro en Ingeniería Civil con mención en Diagnóstico y Reparación de Construcciones Patrimoniales y Existentes que presenta:

*Omar Antonio Giovanni Rojas Morales*

Asesor (a):

*Suyeon Kim De Aguilar, PhD*

Lima, 2023

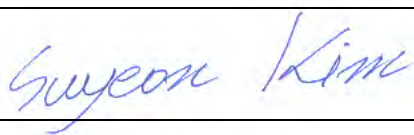
## Informe de similitud

Yo, Suyeon Kim De Aguilar, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) de la tesis/el trabajo de investigación titulado: Aplicación de la enzima ureasa en la estabilización de suelos y la auto-reparación de matrices empleadas en impresión 3D, del/de la autor(a) / de los(as) autores(as): Omar Antonio Giovanni Rojas Morales, dejo constancia de los siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 14 %. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software Turnitin el 16/01/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:

Lima, 2024.

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: Kim De Aguilar, Suyeon	
DNI: 48816908	Firma: 
ORCID: 0000-0003-1621-1489	

# Agradecimiento

Agradezco a mis profesores, compañeros de estudio y amigos del laboratorio Engineering & Heritage, de los cuales rescato su experiencia y amplios conocimientos, que han contribuido en mi formación no solo como profesional, sino también como persona.

Agradezco a mi asesora de tesis, la profesora Suyeon Kim, por ser una guía firme. Al profesor Javier Nakamatsu y al profesor Rafael Aguilar, por su exigencia en todo momento, por todo el apoyo durante estos años y sus palabras reconfortantes en los momentos más difíciles de esta tesis.

Mi gratitud a mis colegas y amigos Jose, Josseline y Robert, por su apoyo durante mi tesis. Estoy seguro de que nuestras interacciones académicas y sus consejos me ayudaron a mejorar la calidad de esta tesis.

Un reconocimiento especial a mis padres y hermanos por su amor incondicional. Con su ejemplo me enseñaron a vivir una vida plena y a ser mejor persona. También me apoyaron y fueron comprensivos en los pasajes más estresantes en todo momento. Todo lo que he conseguido hasta ahora es gracias a ellos. Sus consejos guían mi vida.

*So come over, just be patient and don't worry.*

## Resumen

Aún con los constantes avances en la industria de la construcción, existen puntos clave que continúan siendo relevantes en la toma de decisiones para el diseño y ejecución de un proyecto. Puntos como la selección de un suelo apropiado para cada tipo de proyecto. Ahora bien, uno de los principales impedimentos está relacionado a no poder obtenerse un suelo adecuado que permita garantizar la estabilidad y durabilidad que se requiere. Si a esta problemática le añadimos que, la constante demanda en infraestructura a nivel mundial exige a su vez un incremento en la demanda del hormigón, cuya producción contribuye en la emisión de gases de efecto invernadero y alternativas como la implementación de impresión 3D aplicada a la industria de la construcción introduce varios retos de ingeniería desde el punto de vista de los materiales. La búsqueda de una manera apropiada de estabilizar el suelo, así como poder generar la capacidad de auto-reparación en los elementos impresos, se traduce en una necesidad que requiere pronta atención. Esta tesis propone el desarrollo de una metodología para estabilizar el suelo y para auto-reparar matrices empleadas en impresión 3D catalizadas por la enzima ureasa. De los resultados adquiridos para la estabilización de suelos, la evaluación de durabilidad frente a la erosión por agua nos indicó que la mezcla de suelo modificado con  $\text{CaCl}_2$ -urea con concentración equimolar de 1 M y solución enzimática de 5 U, presenta una pérdida de masa de sólo el 18.35 %, en comparación con la erosión completa de la muestra en el agua en el caso de la mezcla de suelo con agua. Por su parte, el ensayo de compresión indicó que el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las propiedades mecánicas del material con un nivel de resistencia a la compresión inferior de 35.5 % con respecto al de las muestras no estabilizadas. Por otro lado, los resultados adquiridos luego del proceso de reparación para el caso de matrices de suelo muestran que los defectos intervenidos se pudieron rellenar casi por completo, aunque se evidencia la presencia de erosión debido a la inestabilidad de la propia matriz de suelo frente al contenido líquido propio de la solución enzimática. Lo cual no se evidencia en matrices cementicias, donde los defectos se repararon sin evidencia de erosión. Finalmente, el ensayo de compresión en las muestras auto-reparadas indicó que, el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las propiedades mecánicas de matrices de suelo. Esto debido a la erosión mencionada con anterioridad al aplicarse la solución enzimática directamente. Por su parte, el uso de una solución enzimática logra mantener las propiedades mecánicas de matrices cementicias, donde se alcanza un valor idéntico en resistencia a la compresión con respecto al de las muestras intervenidas.

# Abstract

Even with the constant advances in the construction industry, there are crucial points that continue to be relevant in the decision-making process for the design and execution of a project. Points such as the selection of an appropriate soil for each type of project. However, one of the main impediments is related to not being able to obtain adequate soil to guarantee the required stability and durability. If we add to this problem that the constant demand for infrastructure worldwide requires an increase in the demand for concrete, whose production contributes to the emission of greenhouse gases, and alternatives such as the implementation of 3D printing applied to the construction industry introduce several engineering challenges from the point of view of materials. The search for an appropriate way to stabilize the soil, as well as to be able to generate the capacity of self-healing in the printed elements, translates into a need that requires early attention. This thesis proposes the development of a methodology to stabilize soil and to self-repair matrices used in 3D printing catalyzed by the enzyme urease. From the results acquired for soil stabilization, the evaluation of durability against water erosion indicated that the soil mixture modified with  $\text{CaCl}_2$ -urea with equimolar concentration of 1 M and 5 U enzyme solution, presents a mass loss of only 18.35 %. In comparison with the complete erosion of the sample in water in the case of the soil-water mixture. The compression test indicated that the use of an enzyme solution negatively affected the mechanical properties of the material with a level of compressive strength 35.5 % lower than that of the non-stabilized samples. On the other hand, the results obtained after the repair process for the case of soil matrices show that the intervened defects could be almost filled, although the presence of erosion is evidenced due to the instability of the soil matrix itself against the liquid content of the enzymatic solution. This is not evident in cementitious matrices, where the defects were repaired without evidence of erosion. Finally, the compression test on the self-repaired samples indicated that the use of an enzyme solution negatively affected the mechanical properties of soil matrices. This was due to the previously mentioned erosion when the enzyme solution was applied directly. However, the use of an enzymatic solution did not show a significant increase in the mechanical properties of cementitious matrices, where an identical value in compressive strength was achieved with respect to that of the treated samples.

# Índice

<b>Agradecimiento</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Índice</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Motivación</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Objetivos</b>	<b>4</b>
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
<b>1.3 Organización</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 2. Estado del arte</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Estabilización de suelos</b>	<b>7</b>
2.1.1 Estabilización mecánica de suelos	8
2.1.2 Estabilización física de suelos	8
2.1.3 Estabilización química de suelos	9
<b>2.2 Aplicación de la biotecnología en la construcción</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1 Microorganismos aplicados en la construcción</b>	<b>10</b>
2.2.1.1 En convivencia con el material constructivo (Hormigón como soporte biológico)	10
2.2.1.2 Como aglomerantes (Suelo estabilizado con bacterias)	11
2.2.1.3 Como aditivo	12
<b>2.2.2 Enzimas aplicadas en la construcción</b>	<b>15</b>
2.2.2.1 Enzimas	15
2.2.2.2 Enzima ureasa	15
2.2.2.3 Como adición (Hormigón auto-reparable)	16
2.2.2.4 Como aglomerante (Suelo estabilizado con enzimas)	17
<b>CAPÍTULO 3. Metodología</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Materiales</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1 Suelo</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Descripción de los ensayos para la estabilización de suelos y reparación de matrices empleadas en impresión 3D</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1 Cuantificación de iones de calcio</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2 Optimización de reacción enzimática</b>	<b>25</b>
3.2.2.1 Cuantificación de precipitación de carbonato de calcio (CaCO <sub>3</sub> )	25
3.2.2.2 Análisis de espectro FTIR	27
<b>3.2.3 Estabilización de suelo</b>	<b>27</b>
3.2.3.1 Durabilidad frente a la erosión por agua	27
3.2.3.2 Ensayo de compresión no confinada en muestras de suelo modificado	28
3.2.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en suelo estabilizado	30

3.2.3.4	Microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) en suelo estabilizado	30
3.2.3.5	Difracción de rayos X (XRD) en suelo estabilizado	30
<b>3.2.4</b>	<b>Auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D</b>	<b>31</b>
3.2.4.1	Reparación de muestras impresas intervenidas	31
3.2.4.2	Ensayo de compresión no confinada en muestras auto-reparadas	32
<b>CAPÍTULO 4.</b>	<b>Análisis y discusión de resultados</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Cuantificación de iones de calcio</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Optimización de precipitación de carbonato de calcio</b>	<b>36</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Análisis de espectro FTIR</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Estabilización del suelo</b>	<b>40</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Durabilidad frente a erosión por agua</b>	<b>40</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ensayo de compresión no confinada en muestras de suelo modificado</b>	<b>43</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Microscopía electrónica de barrido (SEM) en suelo estabilizado</b>	<b>45</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) en suelo estabilizado</b>	<b>46</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Difracción de rayos X (XRD) en suelo estabilizado</b>	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D</b>	<b>48</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Reparación de muestras impresas intervenidas</b>	<b>48</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Ensayo de compresión no confinada en muestras auto-reparadas</b>	<b>49</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Microscopía electrónica de barrido (SEM) en muestras auto-reparadas</b>	<b>51</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) en muestras auto-reparadas</b>	<b>51</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Difracción de rayos X (XRD) en muestras auto-reparadas</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 5.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimización de la precipitación de CaCO<sub>3</sub> mediante la optimización de la concentración enzimática</b>	<b>55</b>
<b>5.2</b>	<b>Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas del suelo estabilizado con solución enzimática</b>	<b>55</b>
<b>5.4</b>	<b>Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas de auto-reparación de filamentos fabricados con matrices empleadas en impresión 3D</b>	<b>57</b>
	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>59</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Falla en pavimentación. Falla generada por inestabilidad de suelo (Hurtado, 2017).	2
<b>Figura 2.</b> Estabilización in situ mediante un rotor de fresado y mezcla. El suelo se tritura para posteriormente mezclarse con cal (Yepes, 2021).	3
<b>Figura 3.</b> Control de polvo y estabilización de suelos. Estabilización mediante la aplicación de cloruros (Yepes, 2021).	3
<b>Figura 4.</b> Desarrollo de musgo y líquenes en el hormigón biológico. Estas alteraciones en la capa del hormigón, proporcionan que la cara superficial presente un aspecto ornamental y mejora estética por las variaciones a lo largo del año (Noguera, 2013).	11
<b>Figura 5.</b> Colocación de múltiples capas. Capa estructural (conformado por hormigón convencional), capa impermeabilizante (desvía humedad fuera de la capa estructural y protege de filtraciones), y capa biología (contiene componentes químicas esenciales que permiten el desarrollo de los musgos o líquenes) (Noguera, 2013).	11
<b>Figura 6.</b> Visión general de los sistemas de mejoramiento de suelos. Sistema de la estabilización de suelos mediante el uso de bacterias. Mejoramiento en características físicas y mecánicas (DeJong et al., 2009).	12
<b>Figura 7.</b> Deposición de carbonato cálcico visible en la superficie después del proceso de reparación llevado a cabo por las bacterias incorporadas. (a) Antes del proceso de auto-reparación. (b) Posterior al proceso de auto-reparación (Kaur et al., 2020).	13
<b>Figura 8.</b> Mezcla de asfalto reforzado con algas sometida a ensayo Marshall. Las características físicas y mecánicas del material se ven mejoradas (Real et al., 2016).	14
<b>Figura 9.</b> Corrosión del hormigón armado. Corrosión debido a la exposición del material al medio ambiente marino, se aprecia que la zona sumergida y la zona de marea, son las más afectadas por su exposición constante al propio ambiente (Flores, 2020).	15
<b>Figura 10.</b> Estructura cristalográfica de la ureasa. Enzima Canavalia ensiformis (Jack bean) con una resolución de 1,49 Å (Begum et al., 2012).	16
<b>Figura 11.</b> Proceso de auto-reparación del hormigón. Proceso de auto-reparación mediante la generación de carbonato cálcico por efecto de reacción de aditivo enzimático con el CO <sub>2</sub> (Rosewitz et al., 2021).	17
<b>Figura 12.</b> Caracterización de suelo. (a) Imagen microscopio óptico de suelo. (b) Curva de distribución granulométrica de suelo (Silva et al., 2022).	23
<b>Figura 13.</b> Proceso de cuantificación de precipitación de CaCO <sub>3</sub> .	26
<b>Figura 14.</b> Proceso de ensayo para evaluar durabilidad frente a erosión por agua. (*) Se emplean las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de CaCO <sub>3</sub> e índice de precipitación, obtenidas en estudios previos.	28
<b>Figura 15.</b> Proceso de ensayo de compresión no confinada en suelo modificado. (*) Se emplean las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de CaCO <sub>3</sub> e índice de precipitación, obtenidas en estudios previos.	29
<b>Figura 16.</b> Proceso de reparación de imperfecciones por impresión. (*) Se emplea la dosificación con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de CaCO <sub>3</sub> obtenida en estudios previos.	32
<b>Figura 17.</b> Proceso de ensayo de compresión no confinada en muestras auto-reparadas.	33
<b>Figura 18.</b> Configuración de tubos de ensayo para precipitación de CaCO <sub>3</sub> . Configuración de tubos de ensayo para variaciones equimolares de CaCl <sub>2</sub> -urea. (a) Configuración de tubo de ensayo para CaCl <sub>2</sub> -urea = 0.3 M. (b) Configuración de tubo de ensayo para CaCl <sub>2</sub> -urea = 0.5 M. (c) Configuración de tubo de ensayo para CaCl <sub>2</sub> -urea = 0.7 M. (d) Configuración de tubo de ensayo para CaCl <sub>2</sub> -urea = 1 M.	37



<b>Figura 19.</b> Cuantificación de precipitación de CaCO <sub>3</sub> . Cuantificación de masa precipitada de CaCO <sub>3</sub> para variaciones equimolares de CaCl <sub>2</sub> -urea y variaciones de concentración enzimática.	38
<b>Figura 20.</b> Índice de precipitación de CaCO <sub>3</sub> . Se evalúa la relación entre la masa teórica y obtenida en las pruebas de tubo de ensayo.	39
<b>Figura 21.</b> Espectros de FTIR. Espectro para concentración equimolares de CaCl <sub>2</sub> -urea de 1 M con variaciones en la concentración enzimática.	40
<b>Figura 22.</b> Ensayo de inmersión total en muestras de suelo. (a) Muestra de suelo control previo a ensayo de inmersión. (b) Muestra de suelo control luego de 45 minutos de inmersión en agua. (c) Muestra de suelo modificado previo a ensayo de inmersión. (d) Muestra de suelo modificado luego de 60 minutos de inmersión en agua.	41
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de pérdida de masa sin solución enzimática. Se ensayan las dosificaciones equimolares de CaCl <sub>2</sub> -urea con mayor eficiencia de precipitación de CaCO <sub>3</sub> . La muestra de suelo control mostró una erosión completa luego de 45 minutos; por tanto, se retiró y se continuó ensayando el resto de muestras.	42
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de pérdida de masa con solución enzimática. Se ensayan las dosificaciones equimolares de CaCl <sub>2</sub> -urea en conjunto con las concentraciones enzimáticas con mayor eficiencia de precipitación de CaCO <sub>3</sub> . La muestra de suelo control mostró una erosión completa luego de 45 minutos; por tanto, se retiró y se continuó ensayando el resto de muestras.	43
<b>Figura 25.</b> Ensayo de compresión no confinada en muestra de suelo. (a) Muestra de suelo control previo a ensayo de compresión. (b) Muestra de suelo control posterior a ensayo de compresión. (c) Muestra de suelo modificado previo a ensayo de compresión. (d) Muestra de suelo modificado posterior a ensayo de compresión.	44
<b>Figura 26.</b> Resistencia máxima a compresión en muestras de suelo. Se ensayan las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a masa de precipitada e índice de precipitación de CaCO <sub>3</sub> . Las muestras de suelo control mostraron un mejor comportamiento en relación de las muestras modificadas.	44
<b>Figura 27.</b> Imágenes SEM de muestras ensayadas. Muestras extraídas de piezas ensayadas a compresión. (a) Muestra suelo control. (b) Muestra suelo modificado con solución equimolar de 1 M de CaCl <sub>2</sub> -urea y concentración enzimática de 5 U.	45
<b>Figura 28.</b> Análisis EDS de muestras ensayadas. Muestras extraídas de piezas ensayadas a compresión. (a) Muestra suelo control. (b) Muestra suelo modificado con solución equimolar de 1 M de CaCl <sub>2</sub> -urea y concentración enzimática de 5 U.	46
<b>Figura 29.</b> Patrón de difracción de rayos X (XRD). Muestras extraídas de piezas ensayadas a compresión. (a) Muestra suelo control. (b) Muestra suelo modificado con solución equimolar de 1 M de CaCl <sub>2</sub> -urea y concentración enzimática de 5 U.	47
<b>Figura 30.</b> Proceso de auto-reparación de filamentos de matrices de suelo. (a) Inmediatamente luego de intervención en filamento. (b) Posterior a 7 días de aplicación enzimática. (c) Posterior a 14 días de aplicación enzimática.	48
<b>Figura 31.</b> Proceso de auto-reparación de filamentos de matrices cementicias. (a) Inmediatamente luego de intervención en filamento. (b) Posterior a 7 días de aplicación enzimática. (c) Posterior a 14 días de aplicación enzimática.	49
<b>Figura 32.</b> Resistencia a compresión en muestras auto-reparadas de matrices de suelo. Resistencia a la compresión de filamentos impresos en 3D de matrices de suelo. (a) Muestras intervenidas. (b) Muestras curadas con agua. (c) Muestras auto-reparadas.	50
<b>Figura 33.</b> Resistencia a compresión en muestras auto-reparadas de matrices cementicias. Resistencia a la compresión de filamentos impresos en 3D de matrices cementicias. (a) Muestras intervenidas. (b) Muestras curadas con agua. (c) Muestras auto-reparadas.	50

<b>Figura 34.</b> Imágenes SEM de muestras de matrices cementicias auto-reparadas. Muestras extraídas de piezas auto-reparadas. (a) Muestra de filamento control. (b) Muestra de filamento auto-reparado con solución equimolar de 1 M de CaCl <sub>2</sub> -urea y concentración enzimática de 5 U.	51
<b>Figura 35.</b> Análisis EDS de muestras de matrices cementicias auto-reparadas. Muestras extraídas de piezas auto-reparadas. (a) Muestra de filamento control. (b) Muestra de filamento auto-reparado con solución equimolar de 1 M de CaCl <sub>2</sub> -urea y concentración enzimática de 5 U.	52
<b>Figura 36.</b> Patrón de difracción de rayos X (XRD) en muestras de matrices cementicias auto-reparadas. Muestras extraídas de piezas auto-reparadas. (a) Muestra de filamento control. (b) Muestra de filamento auto-reparado con solución equimolar de 1 M de CaCl <sub>2</sub> -urea y concentración enzimática de 5 U.	53

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Comparación de la aplicación del proceso de reparación enzimática en muestras de cemento.	18
<b>Tabla 2.</b> Consolidación de métodos utilizados para la aplicación de microorganismos en la industria de la construcción.	20
<b>Tabla 3.</b> Promedio de valores de volumen de alícuota obtenidos para cada solución.	35
<b>Tabla 4.</b> Molaridad obtenida para cada solución mediante proceso de titulación.	35
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de pérdida de masa durante ensayo de inmersión total.	40



# **CAPÍTULO 1. Introducción**

## 1.1 Motivación

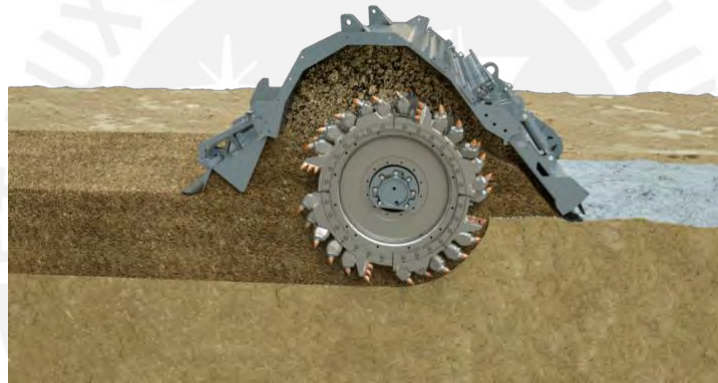
A lo largo de la historia, ha existido una constante evolución con respecto a los métodos y materiales que se han utilizado para la construcción; pasando desde el lodo, las rocas y otros muchos recursos o productos que -mediante un proceso de ensayo y error- se han ido desarrollando (Lozano, 2012). Pese a ello, existen puntos clave en el proceso constructivo que aún en la actualidad siguen siendo relevantes al momento de la toma de decisiones para el diseño y ejecución de un proyecto. Uno de estos puntos clave, sin lugar a duda, es la selección de un suelo apropiado a utilizarse para cada tipo de proyecto ingenieril, teniendo en consideración que, sin importar la envergadura, dicho proyecto estará apoyado en el suelo (Galitskova, 2021). En la Figura 1 se puede apreciar una falla generada en pavimentación debido a la inestabilidad del suelo; indicando que, tanto para pavimentación, cimentación, algún tipo de anclaje o cualquier otra alternativa, el suelo es un punto de crucial ante cualquier proyecto.



**Figura 1.** Falla en pavimentación. Falla generada por inestabilidad de suelo (Hurtado, 2017).

El constante avance en el desarrollo de las estructuras exige una rigurosa preparación técnica que acompañe a la propia estructura desde la etapa de diseño hasta la propia ejecución; todas estas, concadenadas con las distintas normativas, especificaciones y el uso de nuevas tecnologías, para optimizar el logro de obras seguras, duraderas y estéticas. A pesar de todas las medidas que se van desarrollando, no siempre se cuenta con las propiedades necesarias para una óptima ejecución.

Uno de los principales impedimentos está relacionado a no poder obtenerse un suelo adecuado que permita garantizar la estabilidad y durabilidad que se requiere o se desea. En la Figura 2 se evidencia las metodologías empleadas para la estabilización de suelos mediante la incorporación de cal; se realiza *in situ* mediante el empleo de un rotor de fresado y mezcla. Por su parte, la Figura 3 muestra el proceso de control de polvo en la estabilización de suelos mediante la incorporación de cloruros. Ambas como metodologías alternativas que garanticen la propia estabilización de suelos. Si, a su vez, consideramos la creciente importancia medioambiental, la presión social para minimizar la apertura de nuevos vertederos que involucren el movimiento de tierras, y la constante demanda en infraestructura, se hace evidente que la necesidad de utilizar mecanismos para estabilizar suelos ya existentes es un parámetro más que fundamental (Carmona et al., 2016).



**Figura 2.** Estabilización *in situ* mediante un rotor de fresado y mezcla. El suelo se tritura para posteriormente mezclarse con cal (Yepes, 2021).



**Figura 3.** Control de polvo y estabilización de suelos. Estabilización mediante la aplicación de cloruros (Yepes, 2021).

Al examinar la constante demanda de infraestructura a nivel mundial se puede apreciar que, a su vez, existe un incremento en la demanda del hormigón, no solo como material principal sino también como material complementario (ya sea en cimentación, anclaje o demás); es importante considerar que su producción también aporta en la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (Erazo & Pardo, 2023; Lippiatt & Boyles, 2001). Aunque aún se desconoce las emisiones concretas de contaminantes atmosféricos y la carga económica que resultan de las consecuencias sanitarias. Se estima que la producción de hormigón en todo el mundo aporta aproximadamente el 7.8 % de las emisiones de óxido de nitrógeno, el 4.8 % de óxido de azufre, el 5.2 % de partículas inferiores a 10 micras y el 6.4 % de partículas inferiores a 2.5 micras (Miller & Moore, 2020). La valoración económica de los daños derivados de estas emisiones y de las emisiones de GEI asciende a un aproximado de 75 % del valor actual de la industria de la construcción (Elías et al., 2020). Por lo tanto, al considerar la creciente importancia medioambiental, la presión social para minimizar la apertura de nuevos vertederos que involucren el movimiento de tierras, y la constante demanda en infraestructura, se hace evidente que la búsqueda de una manera apropiada de estabilizar el suelo en lugar de sustituirlo y sin la necesidad de agentes reactivos o contaminantes que generen perjuicios significativos en el medioambiente, se traduce en una necesidad que requiere pronta atención (Carmona et al., 2016; L. Chen et al., 2023).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de una solución enzimática que garantice la estabilización de suelos y la auto-reparación de matrices empleadas en impresión 3D.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- i. Optimizar la precipitación de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) mediante la optimización de la concentración enzimática.
- ii. Evaluar las propiedades físicas y mecánicas de la estabilización del suelo modificado con solución enzimática.
- iii. Evaluar las propiedades físicas y mecánicas de la auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D.

### 1.3 Organización

Esta tesis se compone de cinco capítulos.

- **Capítulo 1:** Presenta la motivación, las problemáticas actuales y la importancia del trabajo de investigación. Además, este capítulo introduce los objetivos generales y específicos de la tesis; de la misma manera, presenta una descripción de la organización de este documento que incluye una breve explicación del contenido de cada capítulo.
- **Capítulo 2:** Presenta el estado del arte de las investigaciones relacionadas al uso de la estabilización de suelos y la biotecnología en la industria de la construcción. Este capítulo de revisión se centra en el uso de microorganismos en la industria de la construcción; así como, su uso para generar la capacidad de estabilización en suelos y el uso específico de enzimas para incrementar las capacidades físicas y mecánicas del suelo.
- **Capítulo 3:** Presenta la metodología utilizada en la tesis. Este capítulo se centra tanto en la obtención de los materiales necesarios como en los ensayos de laboratorio que se elaboraron para garantizar una óptima precipitación de  $\text{CaCO}_3$  y su posterior uso en el proceso de estabilización de suelos y auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D. Se evalúa la durabilidad frente la erosión del agua, resistencia a la compresión y la capacidad de auto-reparación.
- **Capítulo 4:** Presenta los valores obtenidos en los ensayos de laboratorio realizados. Tales como la evaluación de su durabilidad frente la erosión del agua, resistencia a la compresión y auto-reparación.
- **Capítulo 5:** Presenta las conclusiones y recomendaciones de la tesis; así mismo, se discute el uso de la metodología en posibles trabajos futuros.



## **CAPÍTULO 2. Estado del arte**



## 2.1 Estabilización de suelos

Para usos ingenieriles, el suelo es un material que cuenta con características terrosas o como depósito de minerales no consolidados (Nortcliff et al., 2011). A su vez, se asume como el material de construcción con mayor antigüedad, complejidad y nivel de usos para los ingenieros o campos relacionados a la industria de la construcción (Rivera et al., 2020). Es sabido que, sin importar la envergadura de la construcción, dicho proyecto estará apoyado en el suelo, ya sea por pavimentación, cimentación, algún tipo de anclaje o cualquier otra alternativa (Galitskova, 2021). Así mismo, el suelo no solo cumple con la función de elemento de soporta, sino también brinda la posibilidad de generar nuevos elementos y materiales, donde podemos encontrar a la mampostería (Nortcliff et al., 2011; Rivera et al., 2020). Con las condiciones necesarias y dadas las demandas de obras ingenieriles, es de esperarse que el suelo en su estado natural no cumpla con los requerimientos de diseño y, por tanto, sea necesario ejecutar un proceso de modificación, estabilización o sustitución del mismo para poder obtener el material requerido (Carmona et al., 2016). Con las metodologías para estabilización de suelos, se pueden incrementar tanto la resistencia a la compresión como la resistencia al corte, proporcionar estabilidad volumétrica, disminuir el rango de plasticidad e incrementar el peso unitario del propio suelo (Hall et al., 2012).

El proceso de estabilización de suelos tiene como finalidad optimizar la calidad de un suelo *in-situ* para mejorar sus propiedades tanto físicas, químicas como mecánicas, en relación a las solicitudes medioambientales y de servicio necesarias (Rivera et al., 2020). Es posible considerar que un suelo es estable cuando posee las propiedades necesarias para asegurar una resistencia que no permita la generación de grandes deformaciones ni excesivo desgaste dadas las condiciones de servicio (Galitskova, 2021). En determinadas ocasiones, un suelo en estado natural puede presentar la composición granulométrica, la plasticidad y el grado de humedad adecuado, de tal forma que, al pasar por un proceso de compactación, presenta las características mecánicas que le permitan ser utilizables como cimentación de una estructura vial. Sin embargo, si no se garantiza un correcto equilibrio entre la interacción y, por tanto, el rozamiento de las partículas y su adhesión, la estabilidad no será la estimada (Pandey & Rabbani, 2017). Con estos procesos de estabilización de suelos puede modificarse características como el control de la expansión, incrementar la resistencia a la compresión, disminuir en rango de plasticidad, reducir la permeabilidad, prevenir la erodibilidad, u otras características. Siendo los métodos de estabilización mecánicos, físicos, químicos y biológicos, los principales métodos de estabilización existentes (Hall et al., 2012; Rivera et al., 2020).

### **2.1.1 Estabilización mecánica de suelos**

Consiste en un proceso de condensación del suelo de forma estática o dinámica (vibraciones) para incrementar tanto la densidad como la resistencia mecánica; así como, reducir la porosidad y permeabilidad. De ser necesario, es posible incluir la mezcla de suelos de diferentes graduaciones para asegurar las especificaciones necesarias. Los principales beneficios que garantiza esta metodología son: incrementar la capacidad portante, reducir el asentamiento, controlar los cambios volumétricos no deseados, disminuir la permeabilidad, e incrementar la estabilidad de taludes (Firoozi et al., 2017).

### **2.1.2 Estabilización física de suelos**

Consiste en modificar las características del suelo a través de la intervención en alguna de sus características para brindarle propiedades estructurales nuevas. Dentro de esta metodología se encuentra el uso de materiales denominados geosintéticos, como es el caso de los geotextiles, los cuales brindan incrementos significativos en las principales propiedades al ser incorporadas en el suelo y son elaborados principalmente con poliéster o polipropileno (fibras sintéticas); ya sea el caso de la filtración (retiene las partículas finas al fluir el agua entre capas), división (entre capas con propiedades diferentes), refuerzo (incrementa la capacidad portante del suelo); así mismo, tenemos las geomallas, las cuales están elaboradas con polietileno de alta densidad y son estructuras tridimensionales con la salvedad de tener la característica de ser mono-orientadas o bi-orientadas, principalmente empleadas para el reforzamiento (incremento en la capacidad portante del suelo); las láminas poliméricas impermeables fabricados en cloruro de polivinilo (PVC) o polietileno de baja y alta densidad, denominadas comúnmente como geomembranas y se caracterizan por su alta resistencia mecánica, permeabilidad y durabilidad en el medio ambiente; los geocompuestos, se produce mediante la combinación de un geotextil no tejido a una malla y son diseñados para estabilizar el suelo brindando tanto resistencia a la compresión como seccionamiento de la base granular y el subsuelo fino; finalmente, las geoceldas, las cuales proporcionan una resistencia a la compresión muy elevada, son sistemas tridimensionales de confinamiento celular elaboradas en paneles de polietileno o polipropileno (J. Liu et al., 2011; Wassie & Demir, 2023).

### **2.1.3 Estabilización química de suelos**

Consiste en adicionar otros materiales o compuestos químicos que permitan modificar las características del suelo; ya sea generada por reacción química o mediante la fundación de una matriz que aglomere las partículas del propio suelo (Afrin, 2017). El cemento y la cal han sido los materiales tradicionales para este tipo de estabilización, pese a ello, también se han considerado otros productos como sales (cloruro de sodio y cloruro de calcio, por nombrar algunos) y desechos o subproductos industriales (escoria de horno, cenizas volantes) en la estabilización del suelo para la elaboración de carreteras. Sin embargo, es recomendable el uso de dos metodologías, el uso de métodos mecánicos de compactación y vibración en conjunto con métodos químicos, para garantizar la estabilidad requerida. Los factores más relevantes al implementar estas metodologías son el costo y las condiciones medioambientales. De este modo, si la prioridad es modificar la trabajabilidad, plasticidad o distribución de partículas, algunas de las propiedades más relevantes del suelo, se requerirán la aplicación de dosificaciones más bajas de aditivos; así mismo, si la prioridad es modificar la resistencia y durabilidad para aumentar la vida útil en servicio del suelo, será necesaria la aplicación de dosificaciones más altas de aditivos; lo cual implicaría el incremento significativo del costo de implementación (Bahar et al., 2004; Barman & Dash, 2022; Billong et al., 2009).

## **2.2 Aplicación de la biotecnología en la construcción**

La biotecnología hace alusión las aplicaciones tecnológicas de sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, teniendo como finalidad tanto la fabricación o modificación de procesos, como su implementación en usos más específicos. Sus bases están relacionadas con la ingeniería, física, química, biología y medicina; así mismo, su aplicación tiene importantes repercusiones en los fármacos, la industria alimenticia, el tratamiento de residuos en general y la agricultura (Kanellopoulos et al., 2016). El uso de la biotecnología habitualmente se emplea en campos relacionados a la medicina o la industria alimentaria; no obstante, existe evidencia de la extensión a otros campos como es el caso de la construcción, donde recientemente se han evidenciado aplicaciones (Afifudin et al., 2011; L. Chen et al., 2023). Las aplicaciones de la biotecnología en la construcción, están relacionadas con la implementación de relaciones sinérgicas entre materiales de uso convencional y microorganismos, plantas, bacterias, hongos, entre otros, para complementar la carencia en características físicas de los materiales (Allen et al., 2014; Pacheco-Torgal & Labrincha, 2014).

Su uso ha ido obteniendo mayor interés entre los campos de investigación debido a las amplias aplicaciones que se han podido ir desarrollando; ya que brinda una solución tanto a la problemática ecológica como a la demanda energética que la construcción solicita (Chahal et al., 2012). De esta manera, el uso de nuevos materiales y metodologías de elaboración con un grado de sostenibilidad mayor representan un aporte sustancial para la industria (Kanellopoulos et al., 2016; Toirac, 2004). Una perspectiva prometedora para brindar solución a esta problemática, consiste en concebir el potencial de los sistemas naturales como un instrumento que permita mejorar, lo que, aprovechando las relaciones sinérgicas existentes entre materiales de uso convencional en la construcción y la intervención de algunos microorganismos, ha concluido en el desarrollo de materiales y metodologías absolutamente biodegradables que manifiestan un aprovechamiento excepcional (L. Chen et al., 2023; Lippiatt & Boyles, 2001). Dichas relaciones, atribuyen una combinación de componentes o sistemas, que al agruparse constituyen un material diferente; en consecuencia, existe un aumento en las características propias de cada elemento o incluso manifestar ciertas características adicionales en el material (DeJong et al., 2010; Pacheco-Torgal & Labrincha, 2014).

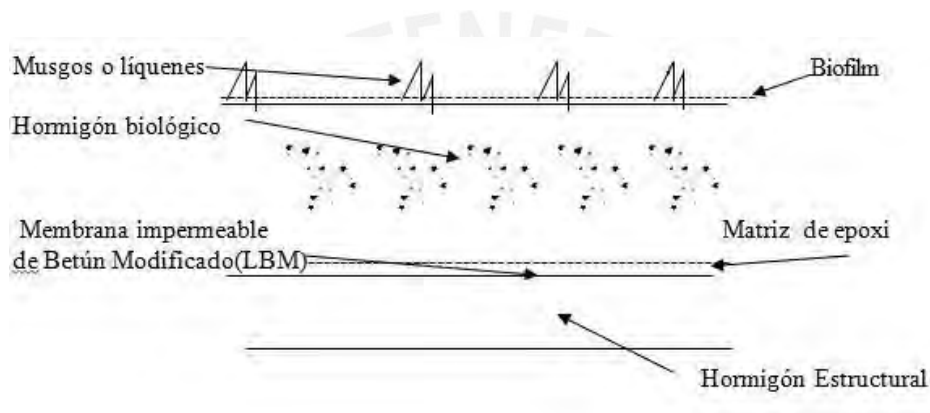
## **2.2.1 Microorganismos aplicados en la construcción**

### **2.2.1.1 En convivencia con el material constructivo (Hormigón como soporte biológico)**

La Figura 4 muestra el caso del hormigón como soporte biológico, donde los organismos se desarrollan directamente sobre la capa superficial del hormigón, sin la necesidad de la incorporación de aditivos o mantenimiento. Adicionalmente, la Figura 5 muestra la colocación de múltiples capas en la parte superficial del hormigón, generando un biofilm (compuesto principalmente por musgos, líquenes y microalgas); para que esto sea posible, el hormigón debe contar con características relacionadas a la acidez. Esto indicaría que puede ser empleados para hormigones que sean más ácidos que los creados a base de cemento Portland, ya que es requerido una reducción en el pH del propio material (Noguera, 2013). Entre los principales beneficios relacionados con esta técnica, sobresale el incremento en las propiedades de aislamiento acústico, aislamiento térmico; también hay evidencia de absorción de CO<sub>2</sub> y de regulación de la conductividad térmica, ya que el material cuenta con la capacidad de captar la radiación solar (Ennaceri et al., 2023); dichas características suponen un valor agregado bajo el punto de vista medioambiental (Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), 2012).



**Figura 4.** Desarrollo de musgo y líquenes en el hormigón biológico. Estas alteraciones en la capa del hormigón, proporcionan que la cara superficial presente un aspecto ornamental y mejora estética por las variaciones a lo largo del año (Noguera, 2013).

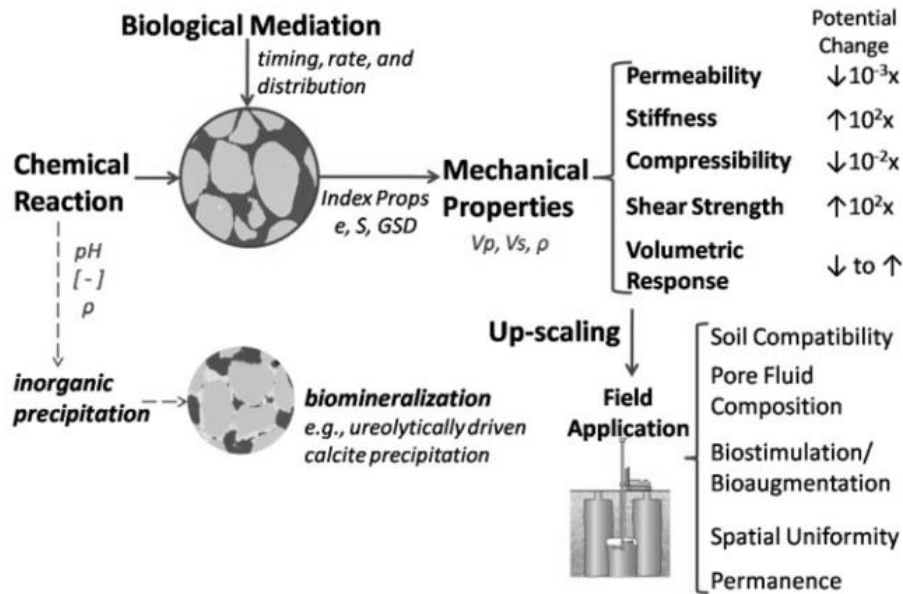


**Figura 5.** Colocación de múltiples capas. Capa estructural (conformado por hormigón convencional), capa impermeabilizante (desvía humedad fuera de la capa estructural y protege de filtraciones), y capa biología (contiene componentes químicos esenciales que permiten el desarrollo de los musgos o líquenes) (Noguera, 2013).

#### 2.2.1.2 Como aglomerantes (Suelo estabilizado con bacterias)

En este caso, el objetivo es beneficiarse de la biodiversidad micro-orgánica propia del terreno, para optimizar sus características mediante la intervención de agentes bacterianos a través de la incorporando de un medio nutriente; garantizando el proceso de biomineralización en el propio suelo (Y. Wang et al., 2023). La Figura 6 muestra una visión general de los sistemas de mejoramiento de suelos; donde se aprecia que, este proceso concibe el aumento en la resistencia a la compresión y la rigidez de terrenos tales como las arenas o gravas no consolidadas. De esta manera, se pretende que el uso de cemento Portland o cal, los cuales forman parte de los principales estabilizadores se reduzca, lo que se traduciría en la disminución de la emisión de CO<sub>2</sub> (Burbank et al., 2011; DeJong et al., 2009; Y. Wang et al., 2023). Los principales beneficios de esta técnica se ven reflejado en la optimización de las características físicas y mecánicas del propio terreno en estado natural y compactado.

Así mismo, se evidencia una reducción en cuanto a la permeabilidad, riesgo de colapso, deformaciones, riesgo de erosiones, y el aumento significativo a cargas de compresión simple y de corte (Van, 2012; Y. Wang et al., 2023).

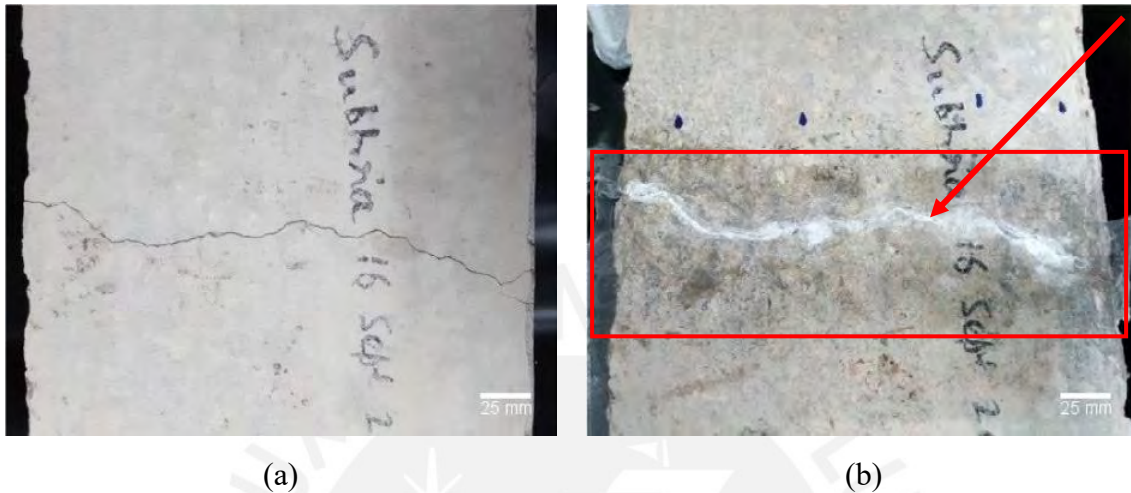


**Figura 6.** Visión general de los sistemas de mejoramiento de suelos. Sistema de la estabilización de suelos mediante el uso de bacterias. Mejoramiento en características físicas y mecánicas (DeJong et al., 2009).

### 2.2.1.3 Como aditivo

- **Hormigón auto-reparable:** La configuración del hormigón auto-reparable es equivalente a la del hormigón tradicional; consiste en la mezcla de cemento, agua, agregados finos y gruesos, y aditivos; con la incorporación de un componente bacteriano (Jonkers et al., 2010). Es necesario realizar una preselección de las bacterias debido al elevado nivel de pH existente en el hormigón, se suele utilizar el *Bacillus sphaericus*; ya que cuentan con la capacidad de tolerar los valores de pH del entorno mencionado (12.5-13.5). Al evidenciarse grietas en el hormigón (Figura 7a), estas quedan expuestas al aire y humedad, generando de esta forma, una reacción química que proporciona carbonato de calcio y sus derivados (Figura 7b) y subsecuentemente el sellado de la propia grieta (Kaur et al., 2020). Los principales beneficios generados por esta técnica radican en la capacidad de auto-reparación del propio hormigón, mejorando así su vida útil y a su vez, disminuyendo la generación de nuevo cemento, lo cual reduce las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera.

Así mismo, también se corrobora un incremento significativo en la capacidad a la compresión del hormigón y un endurecimiento de la mezcla, reduciendo la probabilidad de penetración por sustancias agresivas que puedan dañar la composición o dar lugar a corrosión del refuerzo de acero (De Rooij et al., 2013; Wiktor & Jonkers, 2011).



**Figura 7.** Deposición de carbonato cálcico visible en la superficie después del proceso de reparación llevado a cabo por las bacterias incorporadas. (a) Antes del proceso de auto-reparación. (b) Posterior al proceso de auto-reparación (Kaur et al., 2020).

- **Mezcla de asfalto reforzada con algas:** Normalmente, el aglutinante de asfalto se emplea como aglomerante en las mezclas asfálticas empleadas para el proceso de pavimentación. Dadas sus características como material extremadamente viscoso elaborado a base de residuos de petróleo. No obstante, se ha evidenciado que dichas mezclas presentan algunas deficiencias en su comportamiento estructural, mostrando, especial deficiencia para tolerar las tensiones a las que se pueden ver impuestas (Ramachandran et al., 2001). La adición de polímeros se estudia como una alternativa, que permite mejorar las características mecánicas. En las mezclas es necesario una cantidad de betún añadido muy elevado para poder obtener las características de mejora. Por tanto, se suelen añadir fibras para impedir el drenaje del betún. Las fibras seleccionadas proceden de un tipo de alga denominado *Posidonia oceánica*. Pero la adición de dichos polímeros resulta en una tarea costosa y genera un aumento aun mayor en los residuos sólidos generados y las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera.

La Figura 8 muestra una mezcla asfáltica reforzada con algas sometida a un ensayo Marshall para evaluar sus características físicas y mecánicas; la adición de fibras de algas presenta en general resultados más altos con respecto a la rigidez y al mismo tiempo un aumento significativo en la vida útil del material sometido a fatiga por cargas repetitivas. Así mismo, se evidencia una mejora en la rigidez frente a la presencia de agua (Real et al., 2016).



**Figura 8.** Mezcla de asfalto reforzado con algas sometida a ensayo Marshall. Las características físicas y mecánicas del material se ven mejoradas (Real et al., 2016).

- **Mortero modificado con microorganismos marinos:** La Figura 9 muestra una estructura elaborada de hormigón armado expuesta al medio ambiente marino; uno de los entornos más desafiantes en términos de corrosión, donde se puede evidenciar la presencia de signos más prematuros de deterioro. La corrosión en armaduras resulta una de las causas principales de deterioro y genera un costo muy elevado en mantenimiento. Cualquier superficie sumergida en agua de mar, se ve expuesta a la colonización por microorganismos marinos que forman biofilms. Los hongos y bacterias presentan en dichos biofilms, corroen la capa superficial del hormigón, cambiando la morfología superficial y aceleran la neutralización del hormigón (P.-Y. Chen et al., 2012; Lv et al., 2015). Sin embargo, algunas investigaciones relevan que existen algunos biofilms bacterianos que en realidad podrían proteger contra la corrosión. Para ello es necesaria la selección de bacterias que, como el caso de las *Pseudoalteromonas* y las *Paracoccus marcusii*, cumplan con dicha particularidad. Al aplicarse esta técnica, se puede apreciar una reducción en la permeabilidad del hormigón, interfiriendo así la exposición de sustancias nocivas como cloro o magnesio (Edvardsen, 1999).





**Figura 9.** Corrosión del hormigón armado. Corrosión debido a la exposición del material al medio ambiente marino, se aprecia que la zona sumergida y la zona de marea, son las más afectadas por su exposición constante al propio ambiente (Flores, 2020).

## 2.2.2 Enzimas aplicadas en la construcción

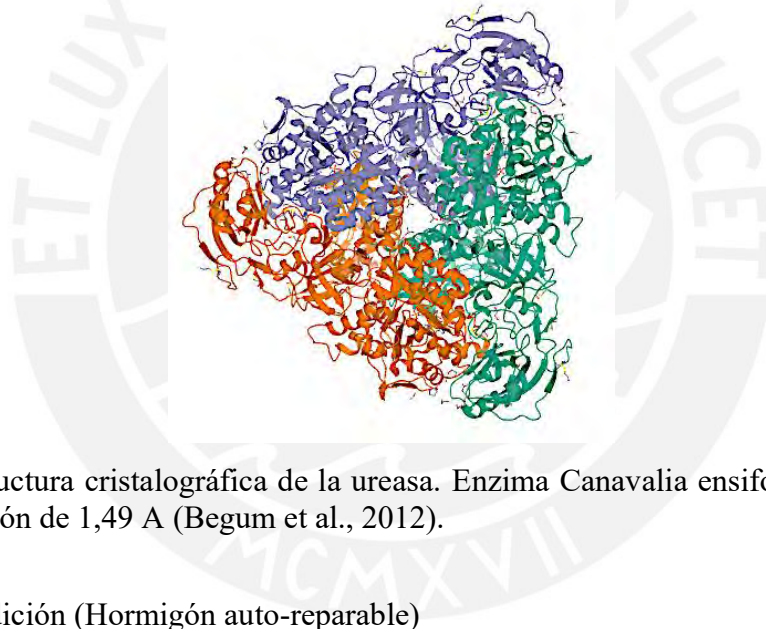
### 2.2.2.1 Enzimas

Siendo proteínas, polímeros constituidos por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, las enzimas catalizan en los organismos una gran diversidad de reacciones químicas (Ramírez & Ayala, 2014). Desde una perspectiva más simplificada se puede entender que las enzimas son conductores que aceleran las reacciones químicas que acontecen en un organismo para que estas ocurran significativamente más rápido. Como cualquier catalizador, al concluir la modificación de sustratos y liberarse la reacción química, la enzima retorna a su estado primario, siendo capaz de implicarse en un nuevo ciclo de catálisis. El uso de enzimas por parte de los seres humanos se remonta a las culturas más antiguas, donde se utilizan las enzimas en la alimentación, para la producción de pan o queso. Actualmente, sus aplicaciones no solo consisten en la elaboración de alimentos y bebidas, sino también en la síntesis de fármacos y otros compuestos primordiales para la industria química (Carmona et al., 2016; Illanes, 2008). El uso de enzimas ha ido obteniendo mayor interés entre los campos de investigación debido a las amplias aplicaciones que se han podido ir desarrollando, ya que brinda una solución tanto ecológica (al minimizar la generación  $\text{CO}_2$ ) como a la demanda energética que la construcción solicita (Rosewitz et al., 2021).

### 2.2.2.2 Enzima ureasa

Las enzimas ureasas (urea amidohidrolasas) son un grupo de enzimas considerablemente distribuidas en la naturaleza, cuya función principal es catalizar la hidrólisis de la urea, siendo sus principales productos el ácido carbónico y el amoníaco (Krajewska, 2009). Una de sus principales características es el consiguiente aumento de pH del entorno de la reacción.

La hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa tiene un gran potencial para las aplicaciones prácticas (Kappaun et al., 2018). Las enzimas pueden ser sintetizadas por numerosos organismos, incluyendo animales, plantas, hongos, algas, bacterias, y también se pueden encontrar en los suelos como enzimas propias del mismo (Rodríguez-Jiménez et al., 2016). Es evidente que son enzimas ampliamente presentes en la naturaleza; la Figura 10 muestra el caso de la enzima ureasa canavalia ensiformis, la cual es obtenida de la soya (Jack bean). El sustrato de la reacción es fácilmente accesible. Generalmente proviene de la excreción de orina de los animales y de la descomposición de los compuestos-N de los organismos muertos; así mismo, su fácil acceso es gracias a su aplicación como fertilizante (W.-H. Wang et al., 2008). Por consiguiente, debido a su predominio, la ureasa juega un papel sustancial en el metabolismo general del nitrógeno en la naturaleza. Siendo su principal función, proporcionar a los organismos nitrógeno en forma de amoníaco para su desarrollo (Krajewska, 2009).

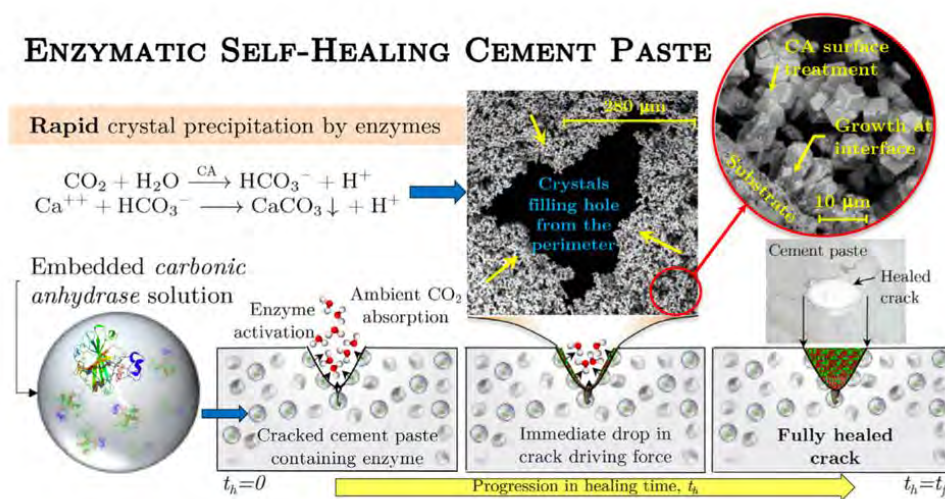


**Figura 10.** Estructura cristalográfica de la ureasa. Enzima Canavalia ensiformis (Jack bean) con una resolución de 1,49 Å (Begum et al., 2012).

#### 2.2.2.3 Como adición (Hormigón auto-reparable)

Como ya se ha mencionado anteriormente, el hormigón es el material más utilizado a nivel mundial, pero a su vez, es intrínsecamente frágil y requiere frecuentes mantenimientos o en el peor de los casos, sustituciones, que resultan ser caras y se traducen en una nueva carga de grandes volúmenes de CO<sub>2</sub> (Ramachandran et al., 2001). Los principales métodos de reparación mediante agentes como el mortero y los epoxis dan lugar a estructuras con una resistencia y resiliencia significativamente reducidas a consecuencia del desajuste de los materiales, por lo que es necesaria la aplicación de una pasta de cemento auto-regenerativa para superar este problema. Como se ha mencionado en los párrafos precedentes, los principales mecanismos de auto-reparación se basan en el uso de microorganismos, pero estos resultan ser lentos y con una aplicación bastante limitada, sin mencionar los efectos

desconocidos para la salud (De Belie, 2016). Con base en estos inconvenientes, se han realizado investigaciones para desarrollar un mecanismo de autocuración en una matriz cementante utilizando cantidades traza de la enzima Anhidrasa Carbónica (CA). La Figura 11 muestra el proceso de auto-reparación del hormigón mediante la precipitación de carbonato cálcico; la CA cataliza la reacción entre los iones de calcio y el CO<sub>2</sub> atmosférico para crear cristales de carbonato de calcio con características mecánicas semejantes a las de la matriz cementante. La característica primordial de este método es que no solo garantiza el sellado de las grietas en la estructura, sino que también contribuye en la eliminación del CO<sub>2</sub> en la atmósfera, brindando una solución ambientalmente segura (Rosewitz et al., 2021).

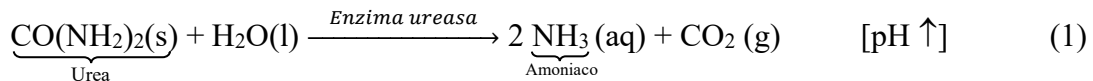


**Figura 11.** Proceso de auto-reparación del hormigón. Proceso de auto-reparación mediante la generación de carbonato cálcico por efecto de reacción de aditivo enzimático con el CO<sub>2</sub> (Rosewitz et al., 2021).

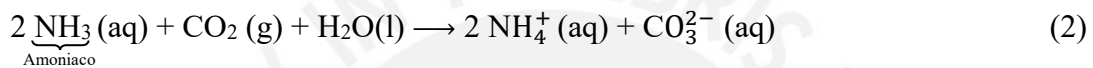
#### 2.2.2.4 Como aglomerante (Suelo estabilizado con enzimas)

Como ya se ha mencionado anteriormente, los suelos con propiedades mecánicas deficientes requieren frecuentemente una mejora en sus características mecánicas, principalmente en la resistencia y la rigidez. Una de las técnicas con mayor aplicación en la actualidad es la de aplicar carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>) precipitado, sin embargo, esta técnica requiere frecuentemente de una metodología compleja, delicado cultivo y almacenamiento de las bacterias, la cual limita considerablemente su aplicación en el campo (Valencia et al., 2012). Como alternativa para promover la precipitación de CaCO<sub>3</sub>, se están investigando procedimientos que involucran la precipitación enzimática de CaCO<sub>3</sub> mediante la mezcla de suelo con urea, cloruro de calcio y enzima ureasa.

Al aplicarse esta técnica, se aprecia que el uso de la enzima ureasa promueve la hidrólisis de la urea y precipitación de  $\text{CaCO}_3$ , generando de esta forma, un fortalecimiento del suelo estabilizado (Carmona et al., 2016). La investigación relativa a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  inducida por microbios en un suelo poroso suele consistir en la introducción de la bacteria exógena *Sporosarcina pasteurii* en el suelo para dar inicio con la hidrólisis de la urea a través de la enzima ureasa (Carmona et al., 2016).



**Ecuación 1.** La urea presente en el suelo ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), interactúa con el agua en estado líquido, y mediante la catálisis generada por la enzima ureasa, se genera amoníaco en estado acuoso y la liberación de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en forma de gas, aumentando de esta forma, los niveles de pH en el suelo (Chou et al., 2011).



**Ecuación 2.** Al interactuar nuevamente con el agua en estado líquido, se generan tanto iones de amoníaco como iones de carbono en forma acuosa (Chou et al., 2011).



**Ecuación 3.** Estos iones de carbono en forma acuosa, al interactuar con una fuente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), resultan en la generación espontánea de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) en estado sólido (Carmona et al., 2016; Chou et al., 2011).

**Tabla 1.** Comparación de la aplicación del proceso de reparación enzimática en muestras de cemento.

Atributo	Proceso con enzimas	Proceso MICP	Mejora
Salud humana	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No es perjudicial.</li> <li>- Se descompone sin riesgo.</li> <li>- No produce subproductos nocivos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cepa bacteriana produce un olor desagradable.</li> <li>- Bacterias vuelven al estado de esporas latente.</li> <li>- Genera subproductos antibióticos.</li> </ul>	Más seguro para el uso en entornos humanos.
Producción de $\text{CaCO}_3$	220 g/L por día	1.7 – 60 g/L por día	Eficiencia y tasa mínima cuatro veces mayor.
Consumo de $\text{CO}_2$	Por cada 1g de $\text{CaCO}_3$ producido, se consume 0.1g de $\text{CO}_2$ .	El oxígeno es consumido por el ciclo metabólico de las bacterias aeróbicas.	Elimina los gases de efecto invernadero.
Costo estimado por $\text{m}^3$	\$ 85 - \$ 90	\$ 105 - \$ 120	Costo menor.

Nota: Proceso de reparación enzimática en contraste con la precipitación inducida por agentes bacterianos (MICP) (Adaptado y modificado de (Rosewitz et al., 2021)).

Por su parte, la implementación de impresión 3D aplicada a la industria de la construcción permite elaborar activos físicos a partir de diseños digitales y versátiles mediante la deposición capa a capa de materiales frescos extruibles. La bibliografía actual indica que el uso de esta tecnología para la construcción generaría beneficios socioambientales, económicos y de flexibilidad en el diseño (Bos et al., 2016; Labonnote et al., 2016; Ma et al., 2018). En cuanto al impacto socioambiental, un proceso de construcción que utilice la impresión 3D produciría menos residuos de material debido a su deposición controlada y precisa (Ma et al., 2018). Con estos sistemas se pueden conseguir enormes ahorros de costes, ya que pueden reducir los tiempos de fabricación y la sobreproducción, con un impacto directo en la optimización de la mano de obra. Esta tecnología también aporta flexibilidad a los diseños arquitectónicos, ya que permiten crear elementos decorativos y estructurales con formas complejas, como estructuras bioinspiradas y elementos topológicamente optimizados (Bos et al., 2016; Ma et al., 2018; Safonov, 2019). A pesar de los beneficios potenciales en la industria de la construcción, introduce varios retos de ingeniería desde la perspectiva de los materiales. Los materiales impresos tienen que someterse a una alta tensión de contracción sin el efecto restrictivo de los áridos gruesos. Además, como los materiales se imprimen capa por capa sin encofrado, la superficie en contacto con el aire es inevitablemente grande, lo que permite una alta tasa de evaporación del agua y, por tanto, la contracción plástica durante la fase fresca, así como la contracción por secado durante el estado endurecido en condiciones secas (Le et al., 2012). Dado que la alta temperatura conduce a una alta tasa de evaporación de agua, un buen curado con alta humedad, así como una temperatura razonable, es ideal para un mejor rendimiento endurecido de los materiales impresos. La anchura de los filamentos impresos y el tamaño de las estructuras también afectan a la contracción desde la perspectiva de la tasa de evaporación. Si la contracción se convierte realmente en un factor negativo y perjudicial en el proceso de impresión, debe considerarse la inclusión de fibras, aditivos reductores de la contracción o agentes de curado interno para obtener una contracción baja y mitigar el agrietamiento (Ma et al., 2020; Shakor et al., 2019). Bajo este contexto, el uso de aditivos enzimáticos para poder generar la capacidad de auto-reparación en los elementos impresos resulta ser una solución prometedora para la metodología de impresión 3D.

Investigaciones recientes han evidenciado que la ureasa cruda procedente de semillas de sandía (*Citrullus lanatus*) trituradas tiene el potencial de sustituir a la ureasa disponible en el mercado para la precipitación de carbonatos y para su uso como alternativa de mejora del suelo de bajo impacto ambiental.

El uso potencial de este tipo de técnicas ha revolucionado varias aplicaciones de ingeniería, sin embargo, esta novedosa área aún debe investigarse a fondo para llevarse como un método ambientalmente seguro, rentable y para el desarrollo de nuevas tecnologías (Dilrukshi et al., 2018).

**Tabla 2.** Consolidación de métodos utilizados para la aplicación de microorganismos en la industria de la construcción.

<b>Tipo de microorganismo</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
Biofilms (Musgos, líquenes, microalgas)	En convivencia con material constructivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aislamiento térmico.</li> <li>- Aislamiento acústico.</li> <li>- Absorción de CO<sub>2</sub>.</li> <li>- Absorción de radiación térmica.</li> </ul>	(Ennaceri et al., 2023; Noguera, 2013; Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), 2012)
Bacteria ( <i>Sporosarcina pasteurii</i> )	Como aglomerante (estabilizador de suelo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento en resistencia a permeabilidad.</li> <li>- Aumento en resistencia a deformación y erodibilidad.</li> </ul>	(DeJong et al., 2009; Van, 2012; Y. Wang et al., 2023)
Bacteria ( <i>Bacillus sphaericus</i> )	Como aditivo (auto-reparación)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción del uso de nuevos cementos (reduciendo emisión de CO<sub>2</sub>).</li> <li>- Endurecimiento en mezcla (disminución de penetración de agentes causante de corrosión en refuerzo de acero).</li> </ul>	(Jonkers et al., 2010; Kaur et al., 2020; Wiktor & Jonkers, 2011)
Fibras de alga ( <i>Posidonia oceánica</i> )	Refuerzo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de permeabilidad (impide ataque sustancias como cloro o magnesio).</li> </ul>	(Ramachandran et al., 2001; Real et al., 2016)
Microorganismos marinos ( <i>Pseudoalteromonas</i> y <i>Paracoccus marcusii</i> )	Impermeabilidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción de permeabilidad (impide ataque sustancias como cloro o magnesio).</li> <li>- Endurecimiento en mezcla (disminución de penetración de agentes causante de corrosión en refuerzo de acero).</li> </ul>	(P.-Y. Chen et al., 2012; Flores, 2020)

Enzimas (ureasa)	Como agente aglomerante (estabilizador de suelo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento en resistencia a permeabilidad.</li> <li>- Aumento en resistencia a deformación y erodibilidad.</li> </ul>	(Carmona et al., 2016; Krajewska, 2009; Valencia et al., 2012)
	Como aditivo (auto-reparación)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción del uso de nuevos cementos (reduciendo emisión de CO<sub>2</sub>).</li> <li>- Endurecimiento en mezcla (disminución de penetración de agentes causante de corrosión en refuerzo de acero).</li> </ul>	(De Belie, 2016; Dilrukshi et al., 2018; Iqbal et al., 2021; Krajewska, 2009; Rosewitz et al., 2021)
Enzimas (Anhidras carbónica)	Como aditivo (auto-reparación)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reducción del uso de nuevos cementos (reduciendo emisión de CO<sub>2</sub>).</li> <li>- Endurecimiento en mezcla (disminución de penetración de agentes causante de corrosión en refuerzo de acero).</li> </ul>	(De Belie, 2016; Rosewitz et al., 2021)

---



## **CAPÍTULO 3. Metodología**

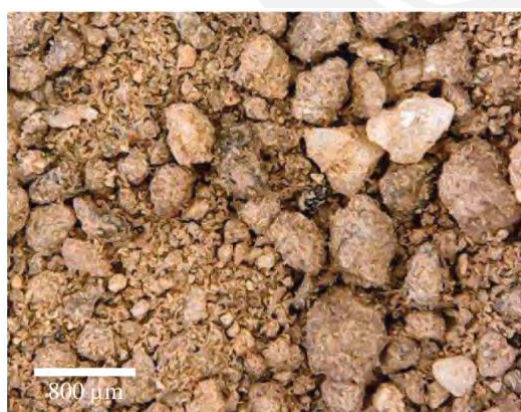


### 3.1 Materiales

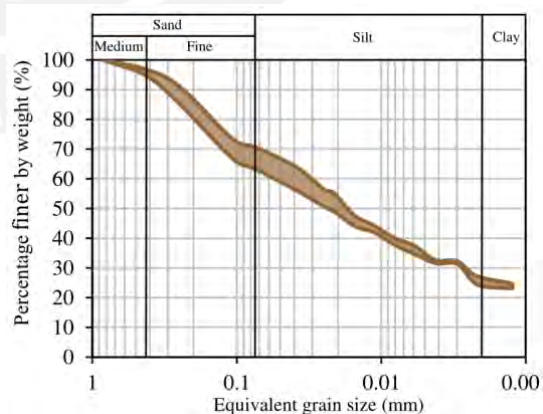
La enzima utilizada para la obtención de carbonato cálcico es la enzima ureasa de *Canavalia ensiformis* (Jack bean), tipo III, en polvo, con 15,000-20,000 unidades/g sólido. Adquirida de la empresa Merck & Co. Por su parte, los sustratos utilizados en el estudio son la urea [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] con un nivel de pureza de 99.5% adquirido de la empresa Merck & Co. Por su parte, el cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) se obtuvo de una fuente alternativa mediante un proceso de cuantificación de iones de calcio.

#### 3.1.1 Suelo

El suelo base empleado en este estudio fue el utilizado por (Silva et al., 2022). El cual se obtuvo de una cantera ubicada en Carabayllo, al norte de Lima, Perú. En la Figura 12a, la microscopía óptica reveló que el suelo base tiene partículas subredondeadas. El análisis de distribución granulométrica del suelo base se realizó mediante análisis granulométrico e hidrométrico de acuerdo con (ASTM D6913, 2009) y (ASTM D7928, 2021), respectivamente, y el rango de curvas granulométricas se presenta en la Figura 12b. El suelo base presenta una dimensión máxima de partícula de 0.84 mm, resultando una relación entre el diámetro de la boquilla y el tamaño máximo de partícula de 12.7. Presentando un tamaño medio de partícula (d<sub>50</sub>) de 0.02 mm y está compuesto por un 4 % en peso de arena media, un 30 % de contenido de arena fina, un 41 % de limo y un 25 % de arcilla, basándose en el rango de tamaño de partícula del suelo recomendado por el Sistema Unificado de Clasificación de Suelos (USCS).



(a)



(b)

**Figura 12.** Caracterización de suelo. (a) Imagen microscopio óptico de suelo. (b) Curva de distribución granulométrica de suelo (Silva et al., 2022).

La plasticidad de los suelos base se evaluó utilizando los límites de Atterberg según la norma (ASTM D4318, 2017) (Silva et al., 2022). Los resultados evidenciaron que el suelo base tiene un límite líquido del 27 % y un límite plástico del 16.2 %. Basándose en esto, la clasificación del suelo lo colocó como arcilla arenosa de baja plasticidad (CL) según la USCS. Finalmente, la gravedad específica se midió en 2.68, siguiendo las directrices de (ASTM D854, 2014). La composición química del suelo base se evaluó mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X. Los resultados mostraron que el suelo base presenta un alto grado de arcillas. Obteniendo como resultado un alto contenido de SiO<sub>2</sub> (58.6 %) y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (15.6 %) debido a la existencia de cuarzo, illita y caolinita (Silva et al., 2022).

### **3.2 Descripción de los ensayos para la estabilización de suelos y reparación de matrices empleadas en impresión 3D**

El procedimiento de ensayos que se lleva a cabo en esta investigación se compone de cuatro conjuntos de ensayos; el primer conjunto de ensayos es el proceso de cuantificación de iones de calcio, que busca optimizar la obtención de concentraciones molares de CaCl<sub>2</sub>; el segundo conjunto de ensayos es la optimización de reacción enzimática que busca examinar la cuantificación de precipitación de CaCO<sub>3</sub>; el tercer conjunto de ensayos, utiliza esta metodología para generar la estabilización del suelo; y finalmente, el cuarto conjunto de ensayos, utiliza la metodología para generar la capacidad de auto-reparación de matrices empleadas en impresión 3D. Los ensayos se realizan por triplicado para asegurar la validez de los resultados.

#### **3.2.1 Cuantificación de iones de calcio**

Para el proceso de cuantificación de iones de calcio en una solución de CaCl<sub>2</sub> comercial se emplea una metodología de titulación. El método denominado titulación se emplea para determinar el contenido y concentración de calcio en una solución. La solución se elabora con el uso de un deshumecedor (CaCl<sub>2</sub>) comercial disuelto en agua desionizada. Las soluciones se elaboran variando la cantidad de agua que se utilizaba para cada contenido total de paquete de deshumecedor, teniendo como cantidades: 500 mL, 1000 mL, 2000 mL, 2950 mL. La metodología empleada una molécula llamada ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que constituye un complejo con los iones de calcio. El calcio puede obtenerse directamente empleando el EDTA, en el instante en que el pH es adecuadamente alto para que el magnesio precipite como hidróxido, empleando un indicador que interactúe exclusivamente con el calcio.

Como indicador se utiliza un colorante rosa/rojo llamado indicador negro de eriocromo T (NeT). Este indicador forma un complejo con los iones de calcio, tornando el color de rosa/rojo a azul en el proceso, pero el complejo colorante-calcio es menos estable que el complejo EDTA-calcio. Como resultado, cuando el complejo calcio-NeT se valora con EDTA, los iones de calcio reaccionan para formar un complejo más fuerte con el EDTA (Bowers & Huang, 1986).



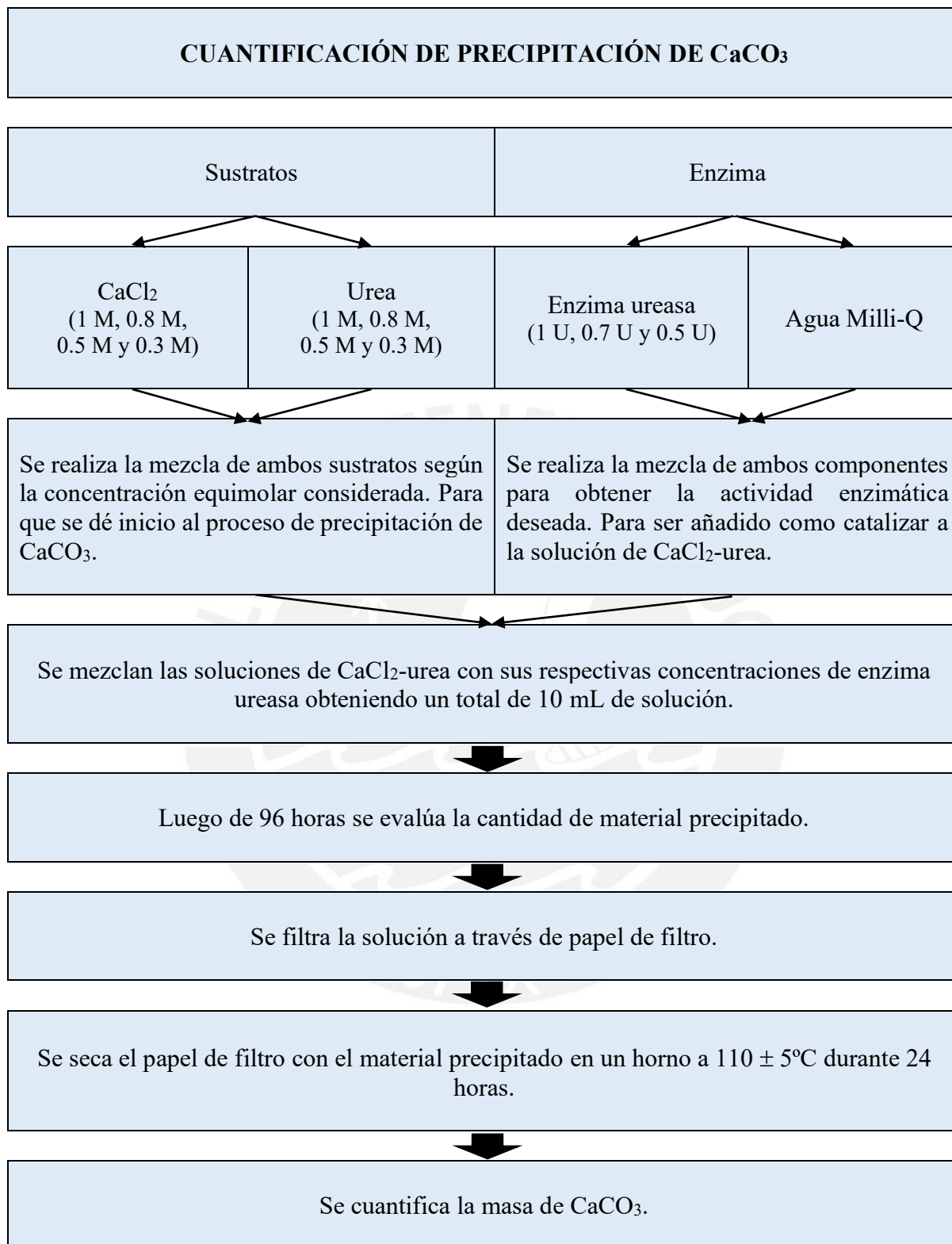
**Ecuación 4.** El colorante NeT forma un complejo con los iones de calcio tornándose de un color rosa/rojo y al añadirse EDTA, ya que el complejo Ca-NeT es menos estable que el complejo EDTA-Ca, este se torna de un color azul.

### 3.2.2 Optimización de reacción enzimática

Este conjunto de pruebas examina la tasa de hidrólisis de la urea biocatalizada por la enzima ureasa. Para ello, se replica el procedimiento utilizado por (Carmona et al., 2016), optimizando las concentraciones de solución equimolar de CaCl<sub>2</sub>-urea para mejorar el proceso de precipitación en el tiempo.

#### 3.2.2.1 Cuantificación de precipitación de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)

Se evalúa la cantidad de CaCO<sub>3</sub> precipitado en los tubos de ensayo en un total de 10 mL para soluciones equimolares de CaCl<sub>2</sub>-urea de 1 mol/L (en sucesivo, M), 0.8 M, 0.5 M y 0.3 M; en conjunto de concentración de ureasa de 1 U/L (en sucesivo, U), 0.7 U y 0.5 U. Las distintas soluciones de CaCl<sub>2</sub>-urea se mezclan a fondo con agua Milli-Q para garantizar la completa disolución de los compuestos químicos. En la Figura 13, se mezcla las respectivas concentraciones de solución de ureasa y solución de CaCl<sub>2</sub>-urea en los tubos de ensayo, lo cual resulta un volumen total de solución de 10 mL. El CaCO<sub>3</sub> precipitado se deposita en el fondo de los tubos de ensayo. Luego de un lapso de 96 horas (tiempo donde se ha determinado que la enzima pierde su actividad (Dilrukshi et al., 2018)), se evalúa la cantidad de material precipitado de la siguiente manera (i) se pesa individualmente el papel de filtro a utilizarse para cada solución; (ii) se filtra la solución a través del papel de filtro; (iii) se seca el filtro de papel colocándolo en el horno para evaporar el contenido de agua y se evalúa la cantidad del sólido depositado; (iv) la cantidad total de CaCO<sub>3</sub> es el peso total de material depositado en el papel de filtro menos el peso propio del papel (Carmona et al., 2016; Dilrukshi et al., 2018; Neupane et al., 2013).



**Figura 13.** Proceso de cuantificación de precipitación de CaCO<sub>3</sub>.

### 3.2.2.2 Análisis de espectro FTIR

La espectroscopia infrarroja de transformación de Fourier (FTIR) es una técnica empleada con la finalidad de adquirir un espectro infrarrojo de absorción o transmisión de una muestra (pudiendo ser un sólido, líquido o gas); en términos generales se podría aducir que es medir cuánta luz absorbe una muestra según cada longitud de onda (Bosch et al., 2002). Una muestra plana tomada de las precipitaciones obtenidas en el ensayo anterior se monta en un portamuestras. En esta tesis se emplea el espectrómetro modelo Frontier de Perkin Elmer con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) con la finalidad de determinar el  $\text{CaCO}_3$  obtenida por la prueba en tubo de ensayo.

### 3.2.3 Estabilización de suelo

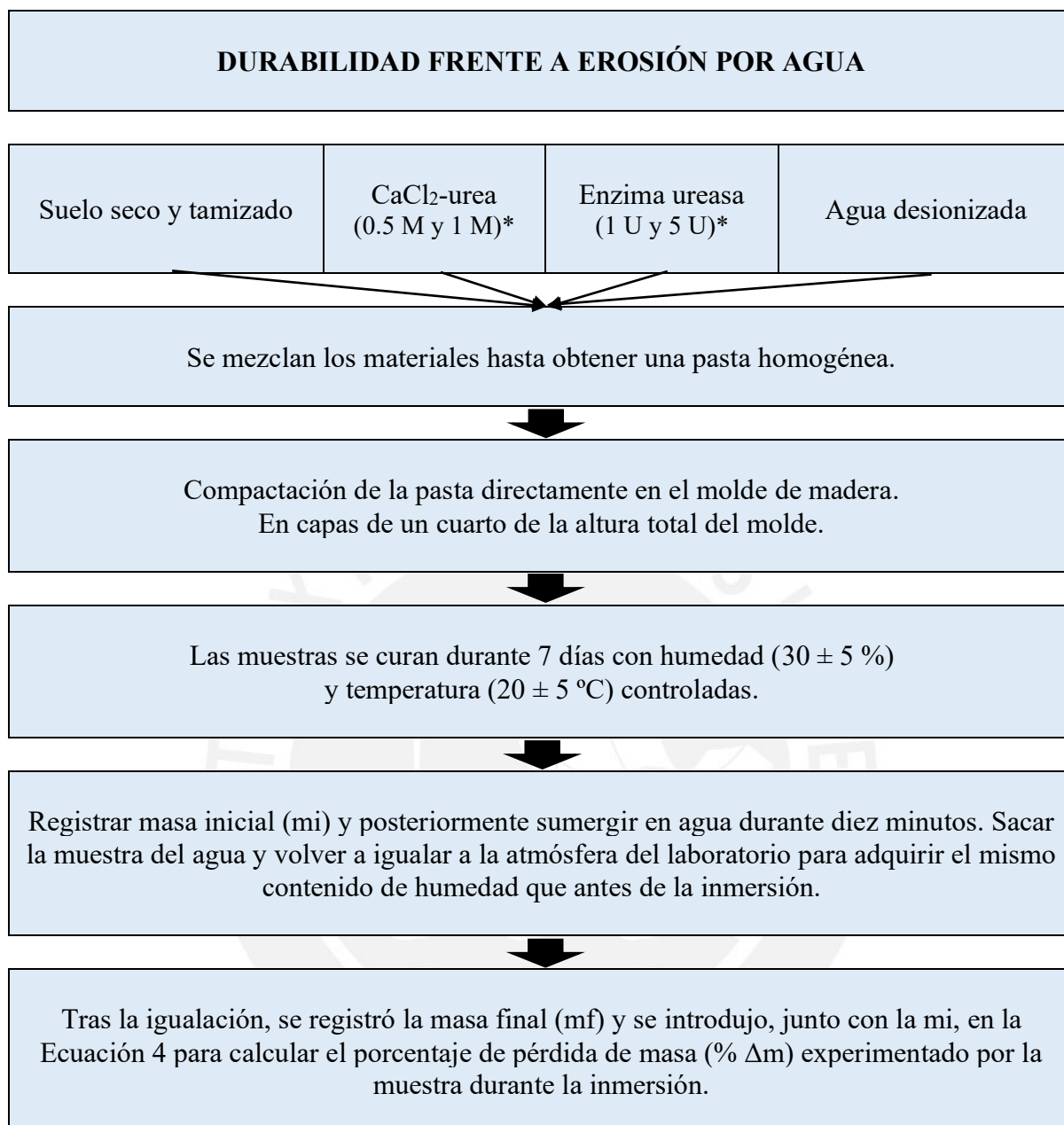
Este proceso tiene como objetivo emplear las dosificaciones obtenidas en los conjuntos de ensayos anteriores para garantizar la estabilización de suelo, mediante la evaluación de durabilidad frente a la erosión por agua y ensayos a compresión no confinada.

#### 3.2.3.1 Durabilidad frente a la erosión por agua

La durabilidad frente a la erosión por agua se evalúa mediante ensayos de inmersión de muestras cúbicas (50 mm x 50 mm x 50 mm) y, como se muestra en la Figura 14, se realiza el ensayo según el protocolo experimental estándar descrito en la norma alemana (DIN 18945, 2018). Antes de los ensayos, todas las muestras se ecualizan en la atmósfera del laboratorio, es decir, a una temperatura de  $20 \pm 5$  °C y una humedad relativa del  $30 \pm 5$  %, hasta que la masa de la muestra variara menos del 0.1 % durante al menos una semana. Tras la igualación, se pesan las muestras para registrar su masa inicial ( $m_i$ ) y posteriormente se sumergen en agua durante diez minutos. A continuación, se extraen las muestras del agua y se vuelven a igualar a la atmósfera del laboratorio para adquirir el mismo contenido de humedad que antes de la inmersión. Tras la igualación, se registra la masa final ( $m_f$ ) y se introduce, junto con la  $m_i$ , en la Ecuación 4 para calcular el porcentaje de pérdida de masa ( $\% \Delta m$ ) experimentado por la muestra durante la inmersión. El procedimiento se repite hasta que la muestra haya perdido un porcentaje significativo de masa o ya no sea manipulable.

$$\% \Delta m = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

**Ecuación 5.** Porcentaje de pérdidas de masa  $\% \Delta m$ . Variación de la masa inicial ( $m_i$ ) y la masa final ( $m_f$ ) de la muestra luego de inmersión total (DIN 18945, 2018).

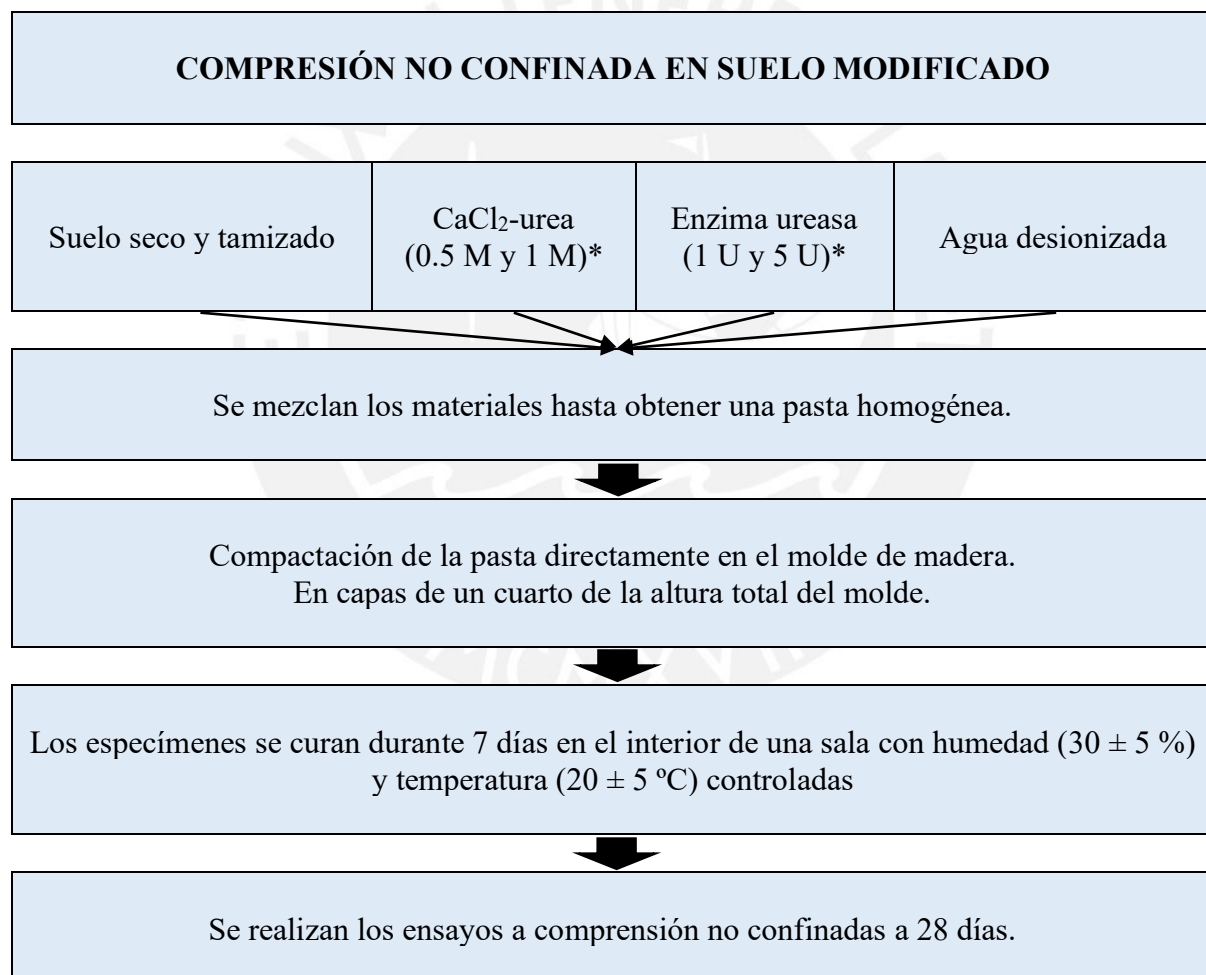


**Figura 14.** Proceso de ensayo para evaluar durabilidad frente a erosión por agua. (\*) Se emplean las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de CaCO<sub>3</sub> e índice de precipitación, obtenidas en estudios previos.

### 3.2.3.2 Ensayo de compresión no confinada en muestras de suelo modificado

Para este proceso de ensayos se replica el procedimiento utilizado por (Carmona et al., 2016; Cuccurullo et al., 2020). Como se muestra en la Figura 15, la mezcla se elabora a partir de suelo seco y tamizado, agua desionizada y la solución enzimática obtenida. Los especímenes de suelo bioestabilizado, se elaboran mediante lo siguiente: (i) el suelo se pasa por un tamiz de malla de 2.0 mm para descartar las partículas principales; (ii) el suelo y las soluciones enzimáticas finales se mezclan para obtener una pasta homogénea; (iii) se compacta la pasta

directamente en el molde de madera (50 mm x 50mm x 50 mm) en cuatro capas; (iv) cada capa se golpea a mano y se compacta con una energía de compactación correspondiente a la prueba Proctor estándar; (v) la superficie de cada capa se escarifica ligeramente y se introduce la siguiente capa; (vi) tras la preparación, los especímenes se curan durante 7 días en el interior de una sala con humedad ( $30 \pm 5\%$ ) y temperatura ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ) controladas; (viii) transcurridos 7 días de curado, cada muestra se extrae del molde para utilizarla en los ensayos; (ix) luego de iniciarse los ensayos y se registran los datos mediante adquisición automática de datos; (x) se realizan ensayos de resistencia a la compresión no confinada (ASTM D2166, 2005) con una velocidad de deformación constante del 1%/min. Los ensayos se repiten tres veces para garantizar la fiabilidad (Carmona et al., 2016; Cuccurullo et al., 2020).



**Figura 15.** Proceso de ensayo de compresión no confinada en suelo modificado. (\*) Se emplean las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de  $\text{CaCO}_3$  e índice de precipitación, obtenidas en estudios previos.

### 3.2.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en suelo estabilizado

Tras los ensayos de compresión no confinada, se observan fragmentos de cada muestra mediante SEM (scanning electron microscope). Utilizando un microscopio electrónico de barrido de la marca FEI, modelo Quanta 650. Una muestra plana tomada de la pieza ensayada a compresión se monta en un portamuestras utilizando cinta adhesiva de carbono de doble cara para introducirla en la cámara de muestras con vacío. La cámara de muestras formaba parte de la unidad principal del SEM. Tras la inserción, se utiliza la ventana de operaciones para obtener imágenes claras con diferentes aumentos, brillo y contraste.

### 3.2.3.4 Microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) en suelo estabilizado

La morfología de la superficie de la muestra se capta cualitativamente mediante imágenes de SEM, y las distribuciones de las composiciones elementales se cuantificaron mediante análisis EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy). Los rayos X se generan cuando el haz de electrones, que se emite desde el cañón, penetra e interactúa con el volumen bajo la superficie de la muestra. Estos fotones tienen energías particulares a los elementos del espécimen; éstos proporcionarán al SEM las capacidades y los llamados rayos X característicos. Se identifican los elementos químicos integrales y se cuantifica su abundancia. Esto permite determinar el mineral representativo y la dureza con cada fase mineral (Y. Liu et al., 2022).

### 3.2.3.5 Difracción de rayos X (XRD) en suelo estabilizado

Las pruebas de XRD (X-ray Diffraction) se realizan directamente sobre algunas muestras, las cuales se distribuyen para formar una capa con una superficie plana dentro de un portamuestras, que posteriormente se introducen en la máquina de XRD. El análisis se realiza con un equipo Bruker D8 Discover DAVINCI XRD equipado con un detector Lynxeye y un tubo de rayos X Cu K $\alpha$ . Los análisis por XRD se basan en la interferencia constructiva de rayos X monocromáticos y una muestra cristalina. Los rayos X producidos por un tubo de rayos catódicos se filtran para generar una radiación monocromática y se coliman para concentrarlos antes de direccionarlos hacia la muestra. Así mismo, la precipitación de carbonato cálcico a partir de cloruro cálcico disuelto produce calcita a temperaturas inferiores a 35 °C, mientras que la vaterita se forma predominantemente junto con la calcita a temperaturas más elevadas (Cuccurullo et al., 2020; Lee & Kim, 2020).

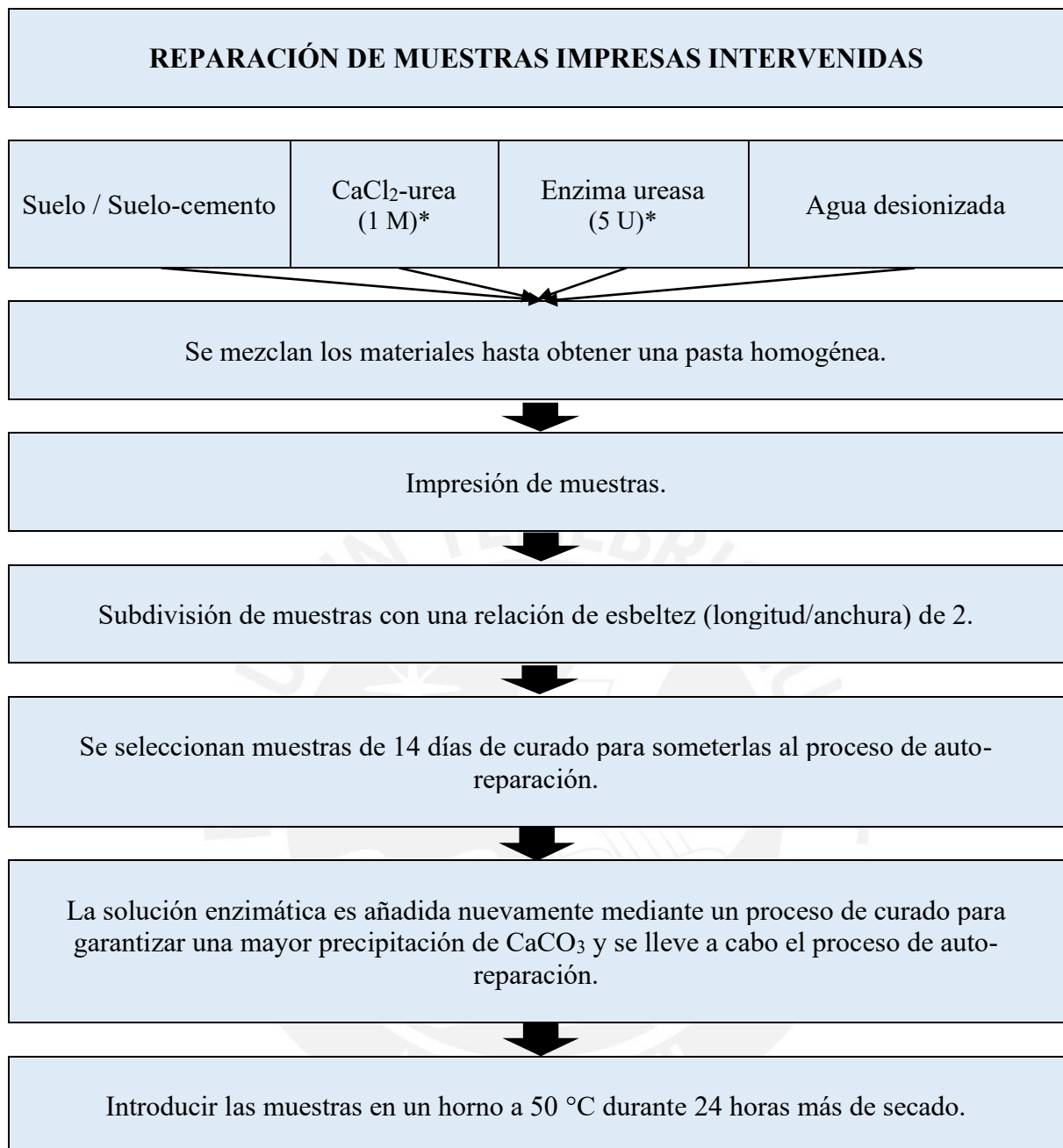


### **3.2.4 Auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D**

Este proceso tiene como finalidad emplear la dosificación de solución enzimática, que proporcionó el mayor índice de precipitación obtenido, para generar la capacidad de auto-reparación de matrices tanto de suelos como cementicias empleadas en la impresión 3D; mediante la reparación de muestras impresas intervenidas y ensayos de compresión no confinada a las muestras reparados.

#### **3.2.4.1 Reparación de muestras impresas intervenidas**

Como se muestra en la Figura 16, el proceso de auto-reparación se lleva a cabo mediante la elaboración de muestras impresas en 3D. Se crean filamentos, los cuales son subdivididos con una relación de esbeltez (longitud/anchura) de 2. Dichos filamentos son manipulados para contar con defectos simulando el agrietamiento por impresión. Se crean muestras con y sin defectos, para realizar ensayos de compresión y comparar las muestras de control con las que presentaban defectos auto-reparadas con la enzima. Se seleccionan muestras de 14 días de curado para someterlas al proceso de auto-reparación. La solución enzimática se mezcla considerando la dosificación obtenida en el proceso de precipitación previamente evaluado (para esta tesis se emplea la solución equimolar de 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y una concentración enzimática de 1 U) y se emplea para llevar a cabo el proceso de auto-reparación sobre toda la superficie de la muestra defectuosa. Posterior a ello, se introducen las muestras en un horno a 50 °C durante 24 horas más de secado (Rosewitz et al., 2021).

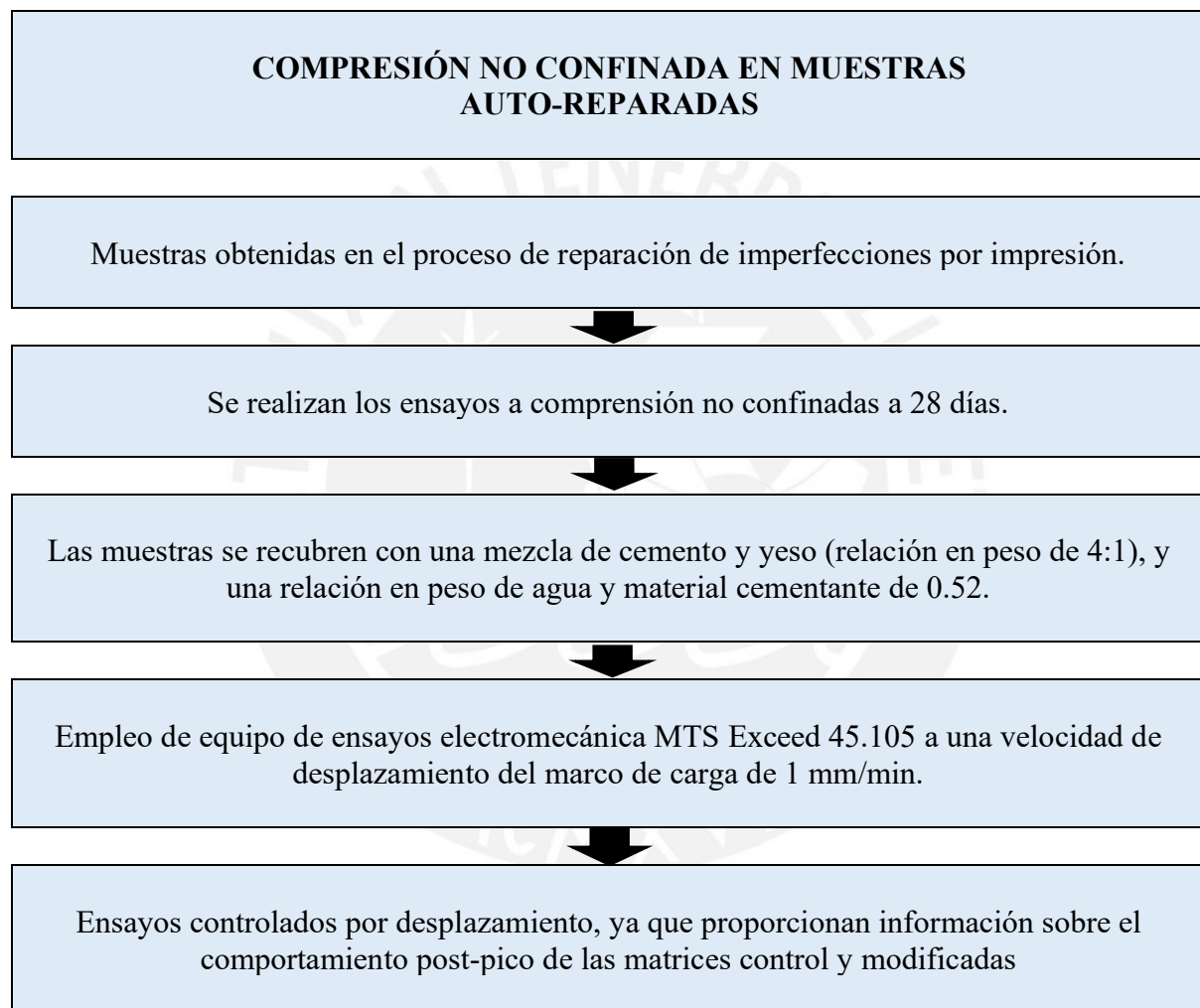


**Figura 16.** Proceso de reparación de imperfecciones por impresión. (\*) Se emplea la dosificación con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de CaCO<sub>3</sub> obtenida en estudios previos.

#### 3.2.4.2 Ensayo de compresión no confinada en muestras auto-reparadas

Para este proceso de ensayos se replica el procedimiento utilizado por (Silva et al., 2022). Como se muestra en la Figura 17, se realizan ensayos de compresión uniaxial a los 28 días después de la impresión de los filamentos (tres muestras por cada matriz) con una relación de esbeltez (longitud/anchura) de 2.

Los ensayos se llevan a cabo empleando un equipo de ensayos electromecánica MTS Exceed 45.105 a una velocidad de desplazamiento del marco de carga de 1 mm/min. Se realizan ensayos controlados por desplazamiento, ya que proporcionan información sobre el comportamiento post-pico de las matrices control y modificadas. Para asegurar una aplicación homogénea de la carga, las probetas se recubrieron con una mezcla de cemento y yeso (relación en peso de 4:1). Las pruebas se realizaron hasta que se detecta una caída del 30 % en la carga máxima (Silva et al., 2022).



**Figura 17.** Proceso de ensayo de compresión no confinada en muestras auto-reparadas.

## **CAPÍTULO 4. Análisis y discusión de resultados**



#### 4.1 Cuantificación de iones de calcio

Como se menciona en los párrafos precedentes, el proceso de cuantificación de iones de calcio se llevó a cabo mediante una metodología de titulación. Para la cual se elaboraron cuatro soluciones de deshumecedor comercial con agua desionizada. La Tabla 3 muestra el volumen de gasto obtenidos como promedio de los tres ensayos realizados por cada solución, empleado una alícuota de 2 mL. Las soluciones se elaboraron variando la cantidad de agua que se utilizaba para cada caja de deshumecedor, teniendo como cantidades: 500 mL, 1000 mL, 2000 mL, 2950 mL; con el objetivo de determinar el contenido de agua necesario para alcanzar la molaridad requerida. La Tabla 4 muestra los valores finales de concentración molar de iones de calcio obtenidos mediante el proceso de titulación variando el volumen de agua.

**Tabla 3.** Promedio de valores de volumen de alícuota obtenidos para cada solución.

	500 mL	1000 mL	2000 mL	2950 mL
V <sub>GASTO</sub> (mL)	12.5 ± 0.1	7.4 ± 0.05	3.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1

La Ecuación 6 se emplea para determinar la molaridad del EDTA en función a la masa que se ha empleado al momento de realizar el proceso de titulación. Esto con la finalidad de poder determinar la concentración molar de los iones de calcio, ya que se trata de soluciones acuosas.

$$M_{EDTA} = \frac{\text{Masa empleada}}{\text{Masa molar} \times \text{Volumen}} = \frac{3.7204 \text{ gr}}{372.24 \frac{\text{gr}}{\text{mol}} \times 1L} = 9.995 \times 10^{-3} \text{ M} \quad (6)$$

**Ecuación 6.** Determinación de la molaridad del EDTA mediante la relación entre la masa empleada y el producto de la masa molar y el volumen.

Finalmente, la determinación de la concentración molar de iones de calcio se realiza utilizando la siguiente ecuación:

$$M_{EDTA} \times V_{GASTO} = M_{CA^{2+}} \times V_{ALÍCUOTA} \quad (7)$$

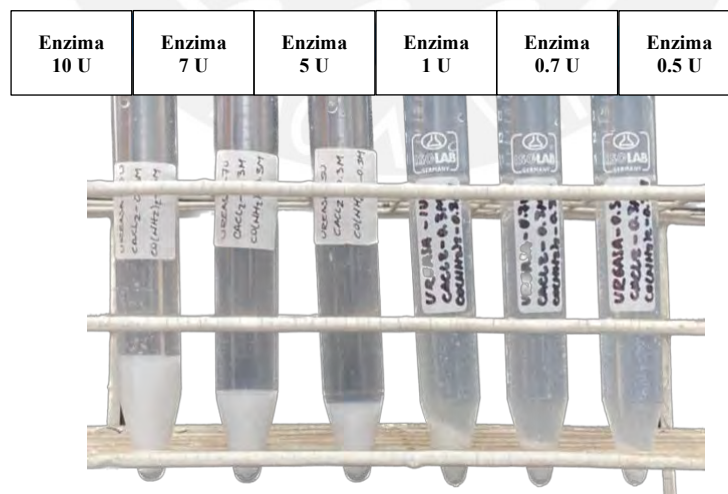
**Ecuación 7.** Relación entre la molaridad del EDTA y la molaridad de iones de calcio

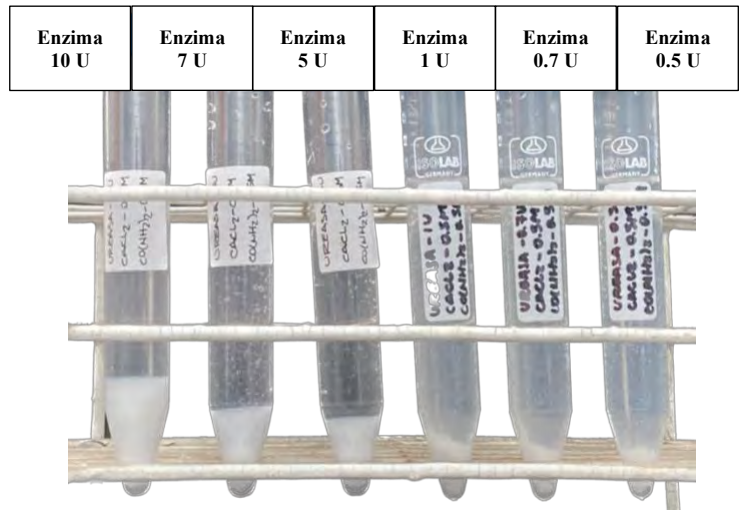
**Tabla 4.** Molaridad obtenida para cada solución mediante proceso de titulación.

	500 mL	1000 mL	2000 mL	2950 mL
M <sub>EDTA</sub>	9.995x10 <sup>-3</sup>	9.995x10 <sup>-3</sup>	9.995x10 <sup>-3</sup>	9.995x10 <sup>-3</sup>
V <sub>GASTO</sub>	12.5	7.4	3.9	2.6
V <sub>ALÍCUOTA</sub>	2	2	2	2
M <sub>CA<sup>2+</sup></sub>	6.26	3.68	1.95	1.31

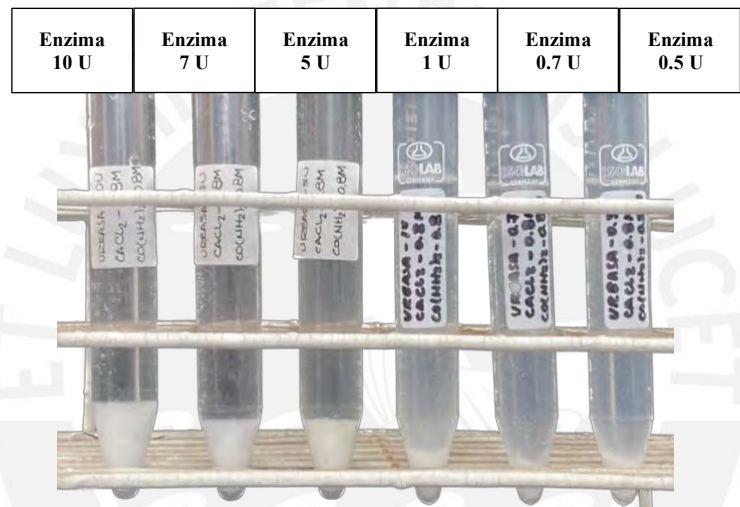
## 4.2 Optimización de precipitación de carbonato de calcio

La variación en las concentraciones de solución equimolar de  $\text{CaCl}_2$ -urea bajo diferentes actividades de ureasa se muestra en la Figura 18. La tasa de cambio de concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ -urea en la solución es directamente proporcional a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . De acuerdo con la Figura 19, cuando la actividad de la ureasa aumenta, la tasa de disminución de  $\text{CaCl}_2$ -urea en la solución aumenta; por lo tanto, la tasa de precipitación de  $\text{CaCO}_3$  aumenta. Esto puede explicarse por el aumento de la tasa de hidrólisis de la urea con el incremento de la actividad de la ureasa. La ureólisis induce cambios geoquímicos que resultan en la formación de  $\text{CO}_3^{2-}$  y finalmente conduce al incremento en la velocidad de precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Además, cuando la cantidad de urea en la solución es pequeña, esa pequeña cantidad de urea se hidroliza más rápidamente que la alta cantidad de urea por una cantidad dada de enzima para una actividad enzimática dada. Por lo tanto, cuando la concentración de  $\text{CaCl}_2$ -urea disminuye, la ureasa con baja actividad ureásica puede utilizarse para hidrolizar la urea y, por lo tanto, para precipitar el  $\text{CaCO}_3$ . Así mismo, la Figura 19 y Figura 20 muestran que, un incremento en la molaridad de  $\text{CaCl}_2$ -urea induce una reducción de la eficacia, es decir, la relación de precipitación disminuye, lo que significa que una gran parte de la urea no se hidroliza. Esto estaría en concordancia con investigaciones como (Carmona et al., 2016; Cuccurullo et al., 2020) donde se identificó que las posibles causas van relacionadas a la rápida hidrólisis de la urea y la saturación de la enzima en la solución.

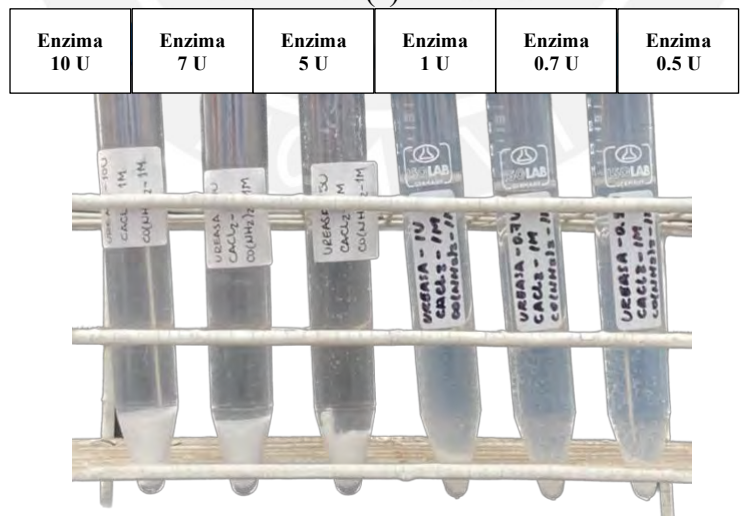




(b)

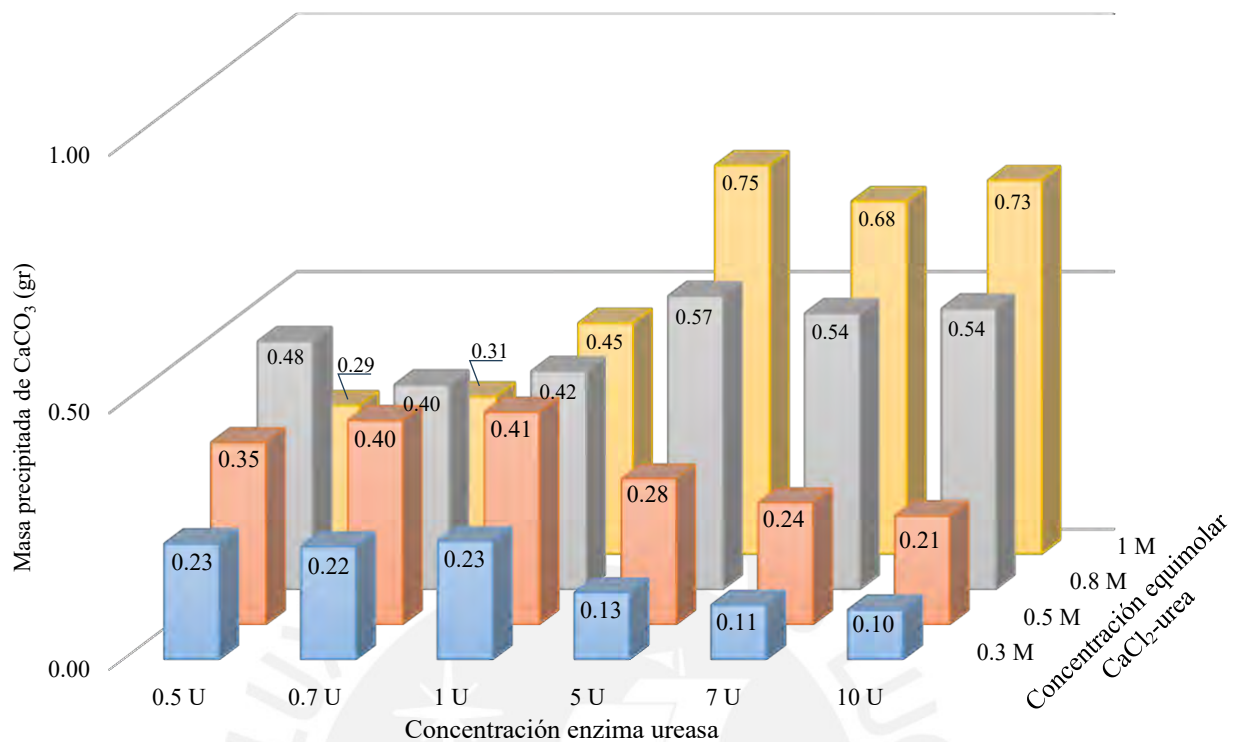


(c)



(d)

**Figura 18.** Configuración de tubos de ensayo para precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Configuración de tubos de ensayo para variaciones equimolares de  $\text{CaCl}_2$ -urea. (a) Configuración de tubo de ensayo para  $\text{CaCl}_2$ -urea = 0.3 M. (b) Configuración de tubo de ensayo para  $\text{CaCl}_2$ -urea = 0.5 M. (c) Configuración de tubo de ensayo para  $\text{CaCl}_2$ -urea = 0.7 M. (d) Configuración de tubo de ensayo para  $\text{CaCl}_2$ -urea = 1 M.



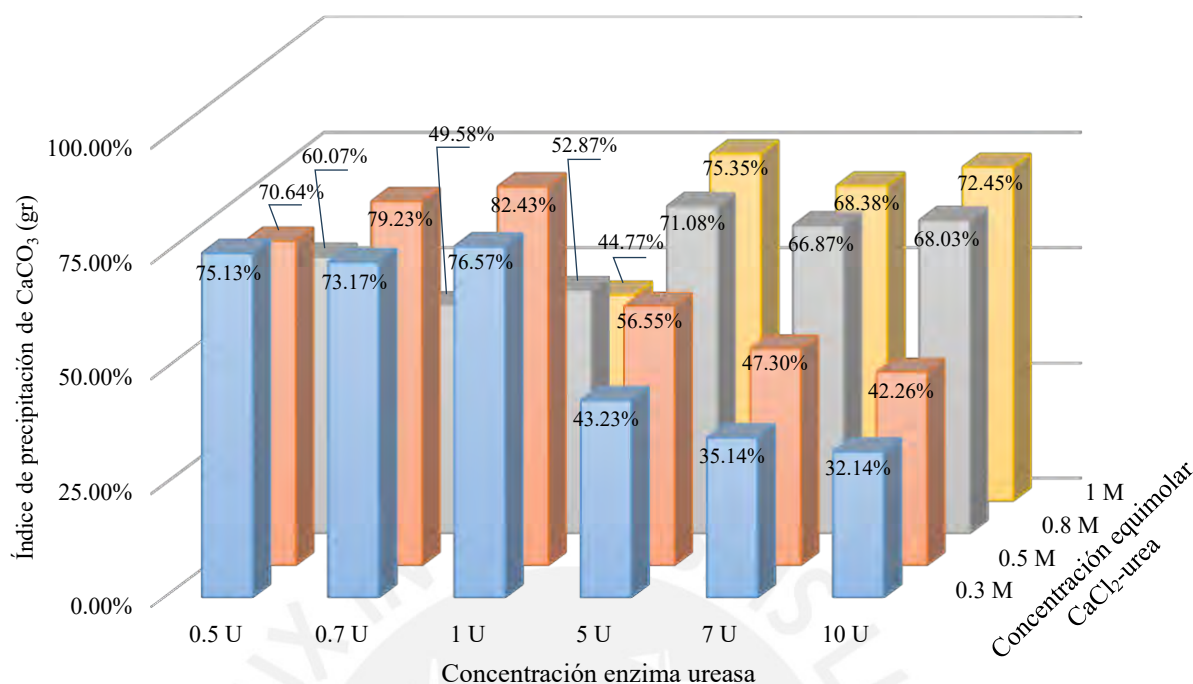
**Figura 19.** Cuantificación de precipitación de CaCO<sub>3</sub>. Cuantificación de masa precipitada de CaCO<sub>3</sub> para variaciones equimolares de CaCl<sub>2</sub>-urea y variaciones de concentración enzimática.

La Figura 20 muestra el índice de precipitación, el cual se define como la relación entre la masa real de calcita precipitada ( $M_{CaCO_3}^a$ ) y la masa teórica de calcita precipitada ( $M_{CaCO_3}^t$ ) obtenidas en los ensayos previos. Por tanto, el índice de precipitación se expresa por la ecuación (Carmona et al., 2016):

$$PR (\%) = \frac{M_{CaCO_3}^a}{M_{CaCO_3}^t} \times 100 = \frac{M_{CaCO_3}^a}{C \times V \times M} \times 100 \quad (7)$$

**Ecuación 7.** Índice de precipitación de CaCO<sub>3</sub>. Donde se evalúa la relación entre la masa teórica y la masa obtenida en la prueba. Siendo donde  $C$  es la concentración molar de la solución,  $V$  es el volumen de la solución en litros y  $M$  es la masa molar de la calcita (100.087 g/mol) (Carmona et al., 2016).



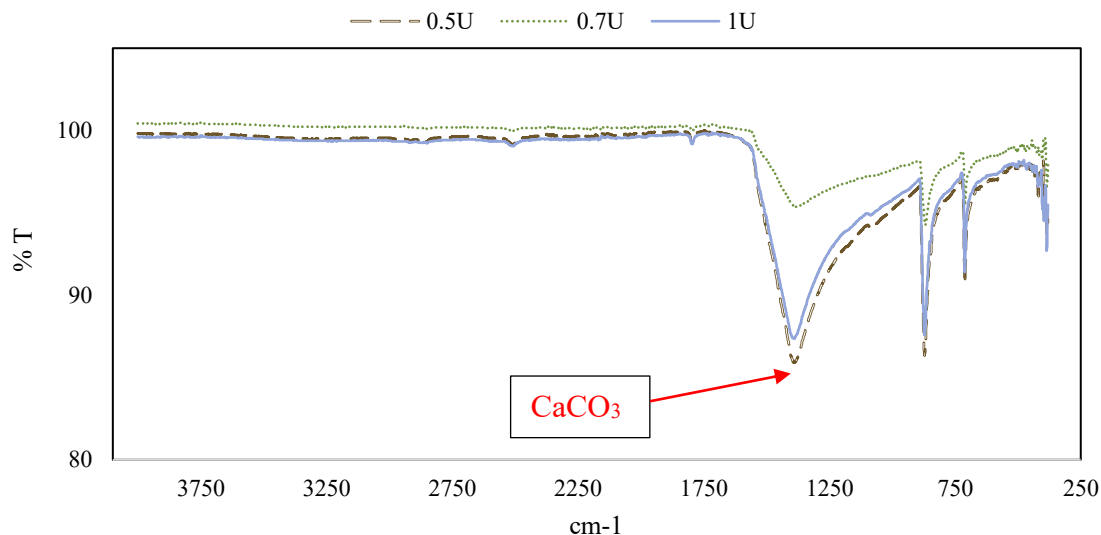


**Figura 20.** Índice de precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Se evalúa la relación entre la masa teórica y obtenida en las pruebas de tubo de ensayo.

De los resultados adquiridos se determinó que el mayor valor de masa precipitada de  $\text{CaCO}_3$  se obtuvo con la solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y una concentración enzimática de 5 U. Por su parte, se determinó que el mayor valor para índice de precipitación de  $\text{CaCO}_3$  se obtuvo con la solución equimolar de 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y una concentración enzimática de 1 U. Dichos valores serán utilizados para el segundo conjunto de pruebas.

#### 4.2.1 Análisis de espectro FTIR

La Figura 21 muestra el espectro de FTIR para concentración equimolar de  $\text{CaCl}_2$ -urea de 0.3 M con sus respectivas variaciones de concentración enzimática. Se determina que, para todos los casos, la composición del material precipitado está compuesta fundamentalmente por  $\text{CaCO}_3$ . Los picos más significativos corresponden a la presencia de  $\text{CaCO}_3$  (Rodríguez-Blanco et al., 2011), lo que confirma que las reacciones teóricas ocurren realmente. No obstante, es importante mencionar que, como se muestra en la Figura 21, existe la presencia de urea y  $\text{CaCl}_2$  que no han precipitado en  $\text{CaCO}_3$ .



**Figura 21.** Espectros de FTIR. Espectro para concentración equimolares de  $\text{CaCl}_2$ -urea de 1 M con variaciones en la concentración enzimática.

### 4.3 Estabilización del suelo

#### 4.3.1 Durabilidad frente a erosión por agua

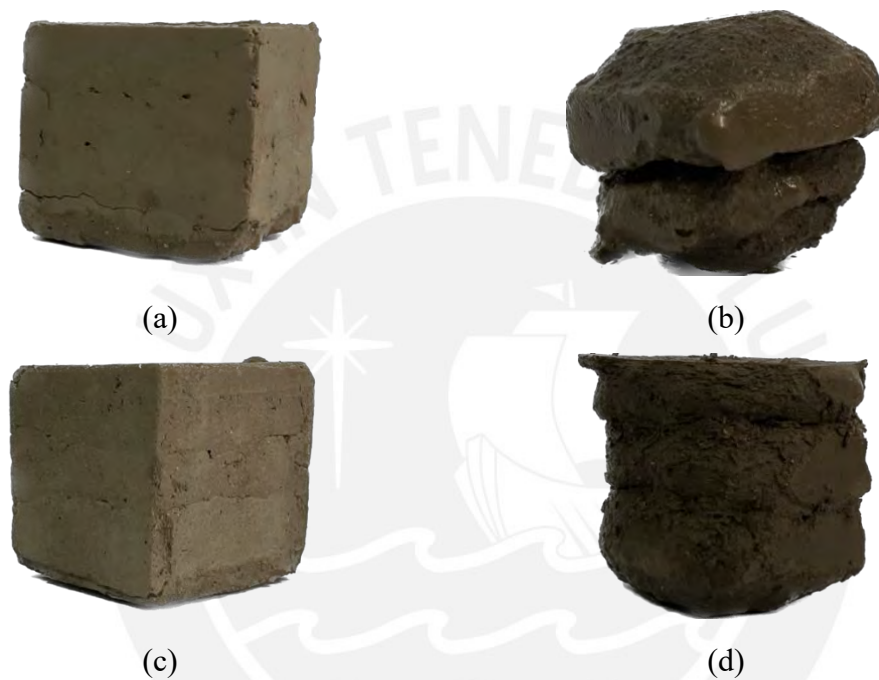
La Tabla 5 resume los resultados de todas las muestras, que indican que la naturaleza hidrófila de los suelos tiene un impacto claramente negativo en la durabilidad al agua. Se han resaltado los valores de porcentajes de pérdida de masa menos elevados durante el ensayo de inmersión total para indicar que la estabilización del suelo mediante la incorporación de una solución enzimática proporciona un incremento significativo en la durabilidad frente a la erosión por agua. Así mismo, es importante recalcar que la muestra de suelo control fue retirada luego de 45 minutos de inmersión en agua ya que presentó una marcada erosión lo cual impidió seguir manipulándola para proseguir con el ensayo.

**Tabla 5.** Porcentaje de pérdida de masa durante ensayo de inmersión total.

Tiempo (min)	Suelo control	0.5 M – 0 U*	1 M – 0 U*	0.5 M – 1 U*	1 M – 5 U*
0	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %
10	2.46 %	0.00 %	0.25 %	0.00 %	0.00 %
30	5.56 %	4.14 %	6.35 %	5.02 %	2.17 %
45	37.81 %	18.44 %	15.90 %	16.87 %	11.64 %
60	-	33.80 %	24.69 %	45.94 %	18.35 %

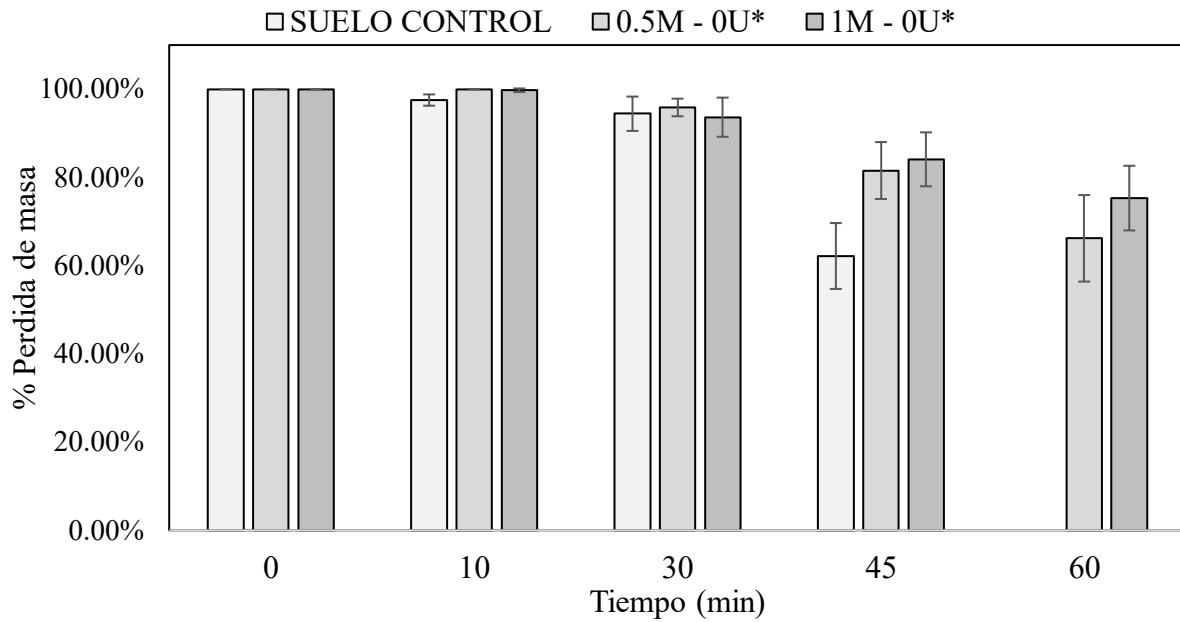
(\*) Se emplean las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a cuantificación de  $\text{CaCO}_3$  e índice de precipitación, obtenidas en estudios previos.

Como se muestra en la Figura 22, la inmersión en agua produce una marcada erosión de la superficie de las muestras. Tanto de la muestra control como de la muestra de suelo modificado con solución enzimática. Dichos resultados estarían acorde con investigaciones como las de (Cuccurullo et al., 2020), donde los datos obtenidos de los ensayos de inmersión demostraron que las muestras estabilizadas presentan una mayor resistencia a la erosión por agua que las no estabilizadas.



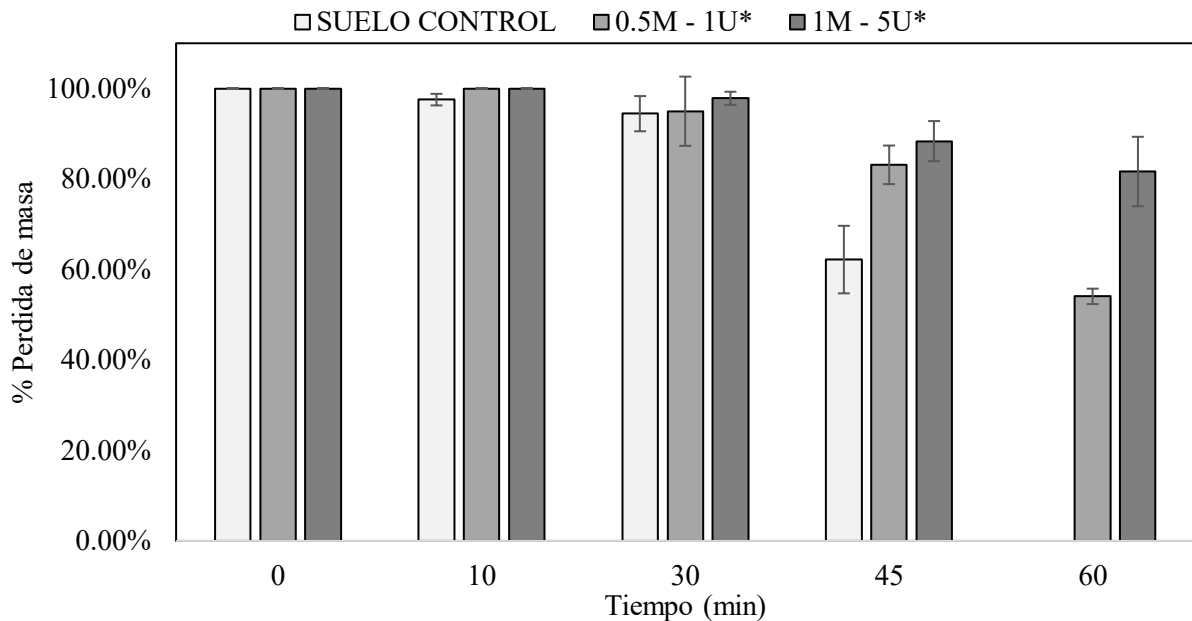
**Figura 22.** Ensayo de inmersión total en muestras de suelo. (a) Muestra de suelo control previo a ensayo de inmersión. (b) Muestra de suelo control luego de 45 minutos de inmersión en agua. (c) Muestra de suelo modificado previo a ensayo de inmersión. (d) Muestra de suelo modificado luego de 60 minutos de inmersión en agua.

La Figura 23 muestra los resultados para el porcentaje de pérdida de masa durante el ensayo de inmersión en muestras modificadas con soluciones equimolares de  $\text{CaCl}_2$ -urea sin la incorporación de solución enzimática. Donde se evidencia que la muestra estabilizada presenta una pérdida de masa de solo el 24.69 % luego de la inmersión total por un lapso de 60 minutos, en comparación con la erosión completa de la muestra en el agua en el caso de la mezcla de suelo con agua desionizada (suelo control) luego de la inmersión total por un lapso de 45 minutos.



**Figura 23.** Porcentaje de pérdida de masa sin solución enzimática. Se ensayan las dosificaciones equimolares de  $\text{CaCl}_2$ -urea con mayor eficiencia de precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . La muestra de suelo control mostró una erosión completa luego de 45 minutos; por tanto, se retiró y se continuó ensayando el resto de las muestras.

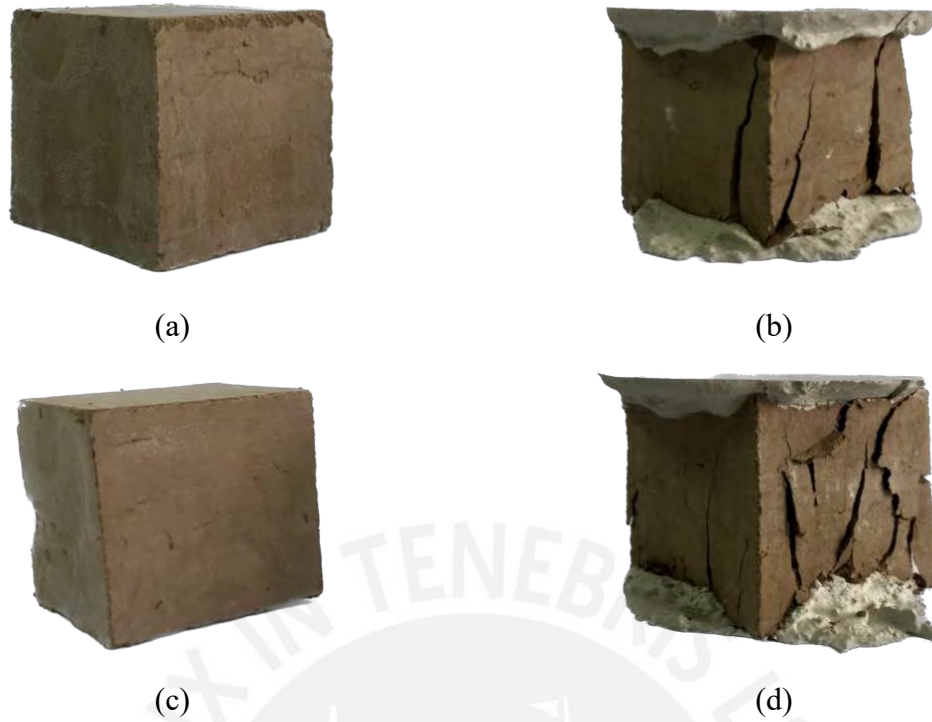
No obstante, como se evidencia en la Figura 24, donde se exponen los resultados para el porcentaje de pérdida de masa durante el ensayo de inmersión en muestras modificadas con soluciones equimolares de  $\text{CaCl}_2$ -urea con la incorporación de solución enzimática. La mezcla de suelo modificado con  $\text{CaCl}_2$ -urea con concentración equimolar de 1 M y solución enzimática de 5 U, presenta una pérdida de masa aún menor, de sólo el 18.35 % luego de la inmersión total por un lapso de 60 minutos, en comparación con la pérdida de masa del 24.69 % para la muestra estabilizada sin solución enzimática y la erosión completa de la muestra en el agua en el caso de la mezcla de suelo control luego de la inmersión total por un lapso de 45 minutos.



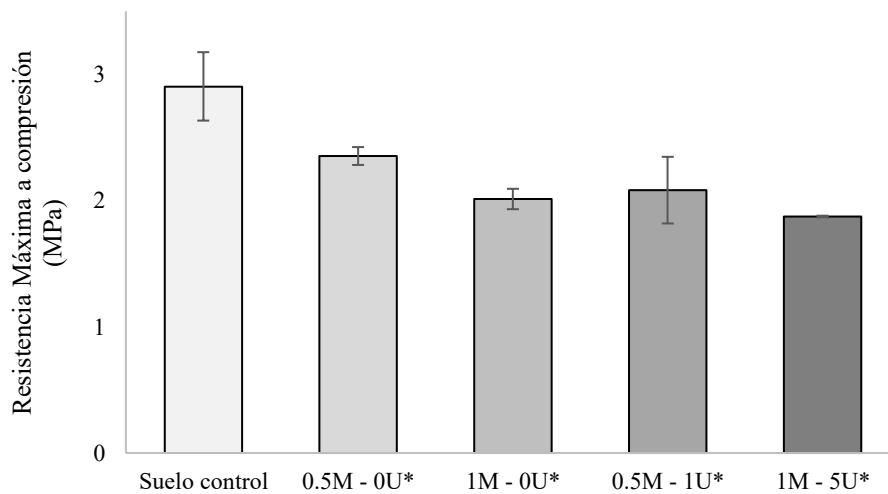
**Figura 24.** Porcentaje de pérdida de masa con solución enzimática. Se ensayan las dosificaciones equimolares de CaCl<sub>2</sub>-urea en conjunto con las concentraciones enzimáticas con mayor eficiencia de precipitación de CaCO<sub>3</sub>. La muestra de suelo control mostró una erosión completa luego de 45 minutos; por tanto, se retiró y se continuó ensayando el resto de las muestras.

#### 4.3.2 Ensayo de compresión no confinada en muestras de suelo modificado

La Figura 25 muestra que posterior al ensayo de compresión no confinada, las muestras tanto de suelo control como de suelo modificado presentan un marcado agrietamiento producto de la carga a la que fueron sometidas. Es evidente que las muestras control presentan un mejor comportamiento en comparación con las muestras modificadas. En particular, el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las propiedades mecánicas del material con un nivel de resistencia a la compresión inferior al de las muestras no estabilizadas. La Figura 26 muestra los valores obtenidos de los ensayos de compresión no confinada aplicados en cada una de las muestras. Las tensiones de compresión se obtuvieron mediante la relación entre la carga aplicada y el área transversal de la probeta cúbica de 50 mm. La relación entre los desplazamientos registrados de la célula de carga y las alturas de la probeta cúbica se consideraron como las deformaciones para generar las curvas de tensión-deformación de compresión. Se evidencia que las muestras control presentan un mejor comportamiento en comparación con las muestras modificadas.



**Figura 25.** Ensayo de compresión no confinada en muestra de suelo. (a) Muestra de suelo control previo a ensayo de compresión. (b) Muestra de suelo control posterior a ensayo de compresión. (c) Muestra de suelo modificado previo a ensayo de compresión. (d) Muestra de suelo modificado posterior a ensayo de compresión.

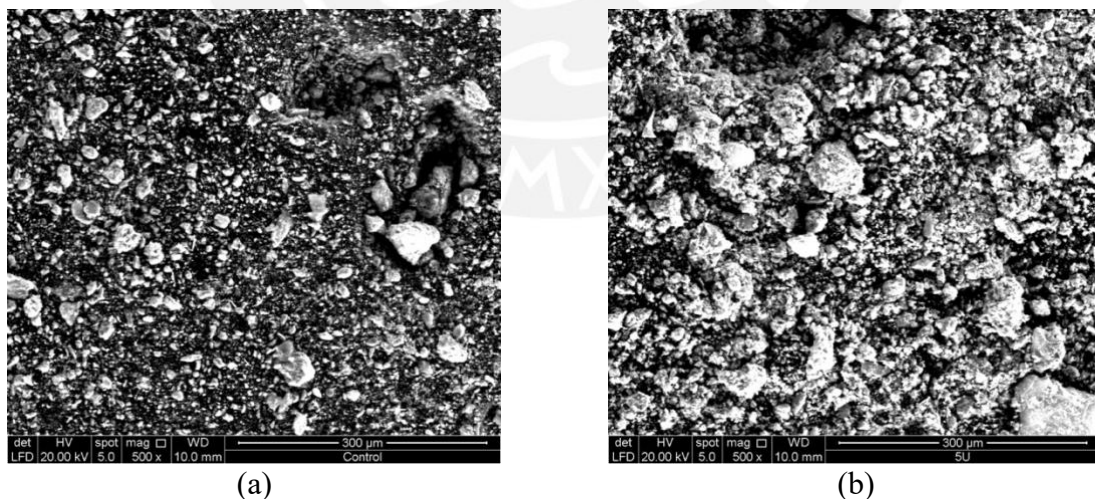


**Figura 26.** Resistencia máxima a compresión en muestras de suelo. Se ensayan las dosificaciones con mayor eficiencia en cuanto a masa de precipitada e índice de precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Las muestras de suelo control mostró un mejor comportamiento en relación de las muestras modificadas.

En particular, el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las propiedades mecánicas del material con un nivel de resistencia a la compresión inferior de 35.5 % con respecto al de las muestras no estabilizadas. La ineficacia en la estabilización del suelo con solución enzimática puede deberse a: (a) la existencia de materia orgánica propias de la cantera de donde proviene el suelo o extraña adherida a las partículas y (b) la presencia de partículas de forma irregular. Este hallazgo concuerda con los datos obtenidos por (Oliveira et al., 2017) y (Almajed et al., 2020) que mostraron que la ineficacia en el tratamiento de suelos que tienen partículas recubiertas de materia orgánica se debe a la débil unión entre las partículas del suelo y los cristales de carbonato. La segunda razón es la presencia de finos en el suelo, este suelo en específico cuenta con la presencia de arcillas lo que dificulta el establecimiento de enlaces efectivos entre las partículas del suelo y los cristales de carbonato (Almajed et al., 2020; Oliveira et al., 2017).

#### 4.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en suelo estabilizado

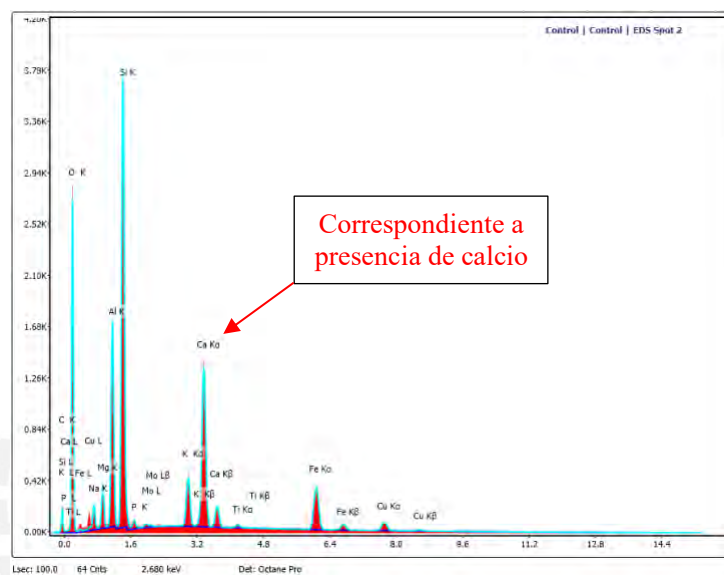
Como se aprecia en la Figura 27, las imágenes SEM muestran la presencia de  $\text{CaCO}_3$  precipitado en la superficie de las partículas de suelo. Además, el polimorfo de calcita se observó claramente en todos los casos de prueba tras ampliar las imágenes SEM independientemente de la actividad de la ureasa y de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ -urea. Las muestras de suelo modificado mostraron un incremento significativo en la presencia de  $\text{CaCO}_3$ .



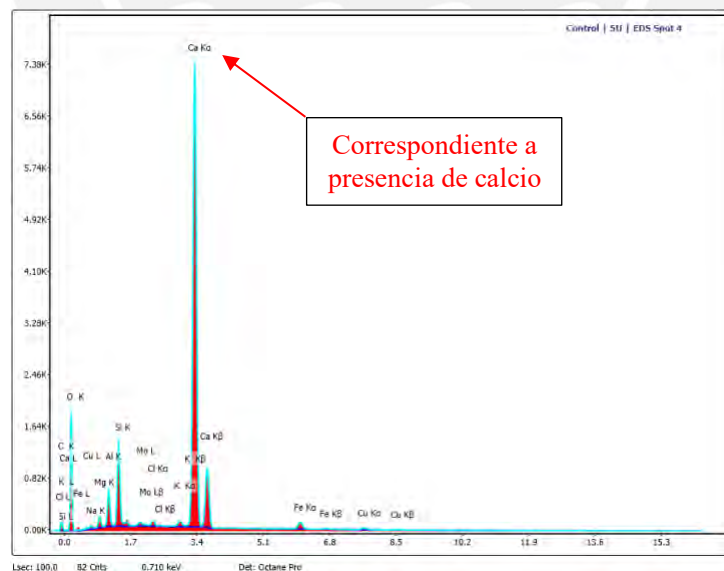
**Figura 27.** Imágenes SEM de muestras ensayadas. Muestras extraídas de piezas ensayadas a compresión. (a) Muestra suelo control. (b) Muestra suelo modificado con solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y concentración enzimática de 5 U.

#### 4.3.4 Microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) en suelo estabilizado

Como se muestra en la Figura 28, existe un incremento significativo en la cuantificación de Ca correspondiente a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  de cada muestra. El análisis de los rayos X característicos provee información química de los elementos de la muestra. Cuando un electrón de una capa interna es arrancado por medio de la interacción de un electrón primario, un electrón de la capa externa puede caer energéticamente y ocupar esa vacancia electrónica, liberando un fotón de rayos X característico de dicha transición electrónica (Y. Liu et al., 2022).



(a)



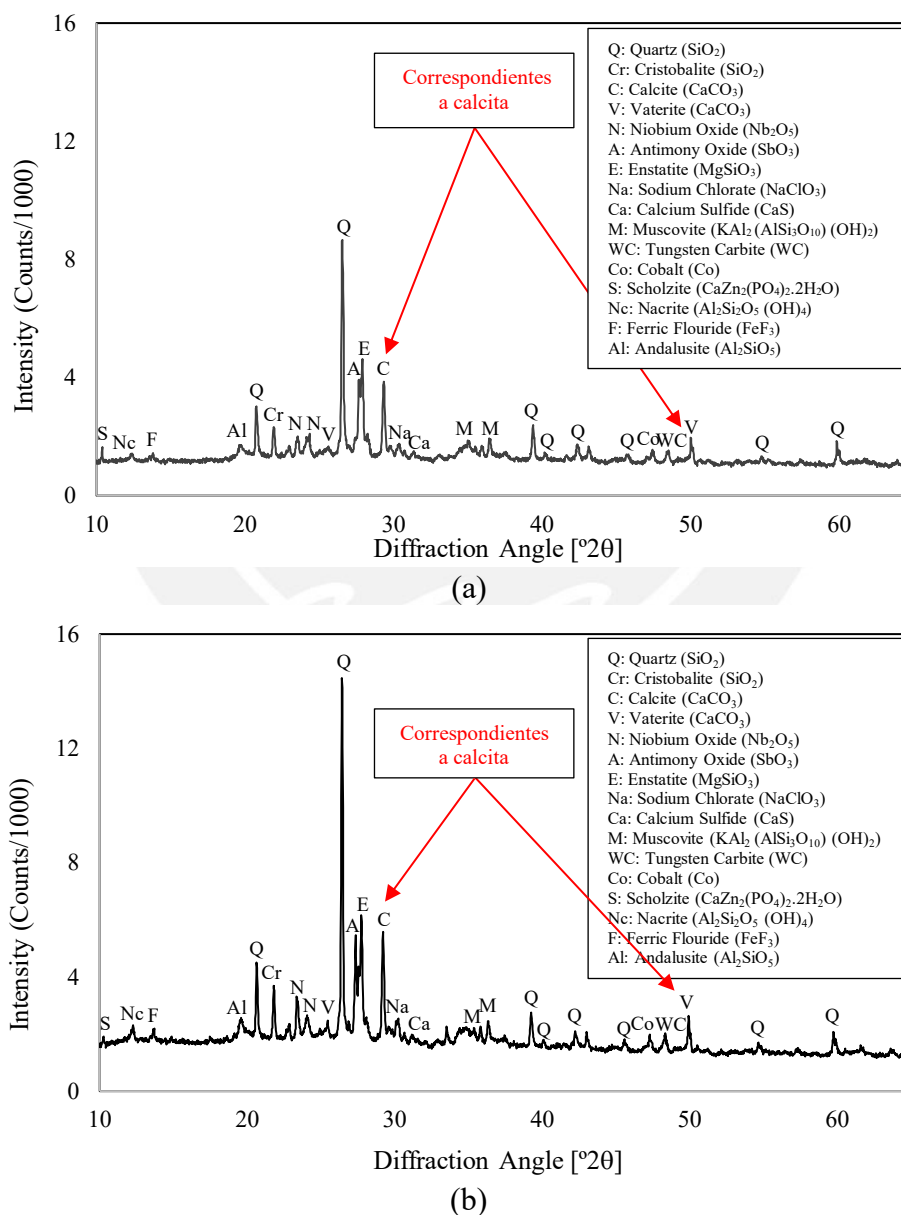
(b)

**Figura 28.** Análisis EDS de muestras ensayadas. Muestras extraídas de piezas ensayadas a compresión. (a) Muestra suelo control. (b) Muestra suelo modificado con solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y concentración enzimática de 5 U.



### 4.3.5 Difracción de rayos X (XRD) en suelo estabilizado

Como se muestra en la Figura 29, los resultados de los análisis XRD en todas las muestras revelaron la presencia de la composición propia del suelo: sílice ( $\text{SiO}_2$ ), alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), óxido de potasio ( $\text{K}_2\text{O}$ ), magnesia ( $\text{MgO}$ ), cal ( $\text{CaO}$ ), óxido de sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) y carbonato de calcio en forma de calcita y vaterita. Se identificó presencia de carbonato de calcio en todas las muestras, tanto en las no estabilizadas como en las estabilizadas; no obstante, se aprecia un incremento significativo del 35 % para calcita y del 45 % para vaterita tanto en las muestras estabilizadas con solución enzimática en comparación con las muestras no estabilizadas.



**Figura 29.** Patrón de difracción de rayos X (XRD). Muestras extraídas de piezas ensayadas a compresión. (a) Muestra suelo control. (b) Muestra suelo modificado con solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y concentración enzimática de 5 U.

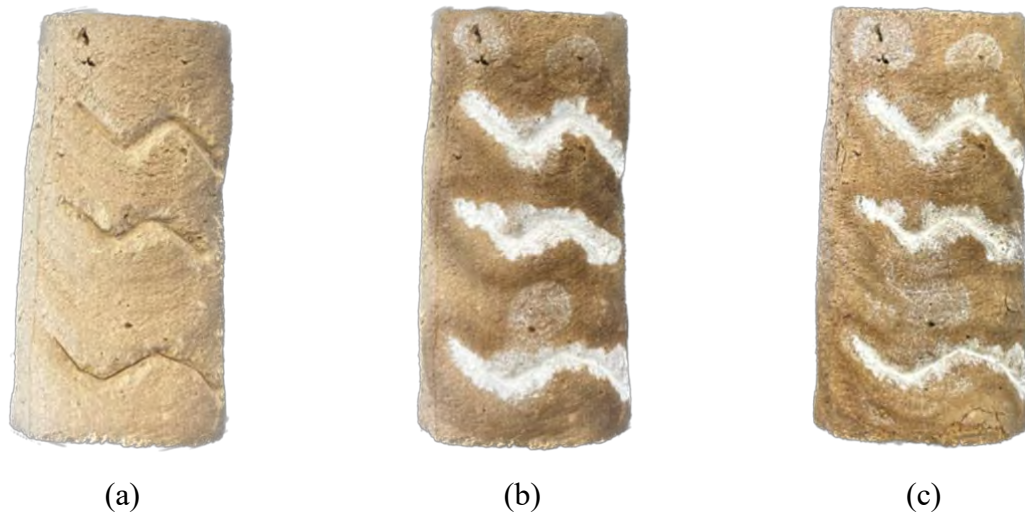
## 4.4 Auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D

### 4.4.1 Reparación de muestras impresas intervenidas

Las Figura 30(a) y Figura 31(a) muestran que las muestras impresas mediante el uso de una impresora 3D, las cuales fueron intervenidas mediante la incorporación de defectos de manera manual. Dichas muestras pueden recuperar su aspecto original (Figura 30(c) y Figura 31(c)) utilizando una cantidad muy pequeña de enzima, que se precipita en un periodo de tiempo muy corto (lapso menor a 24 horas posterior a la aplicación de solución enzimática). El gran tamaño de los defectos reparados ( $\sim 1$  mm) muestra la capacidad del método propuesto en la reparación de muestras de suelo y agua. Los datos obtenidos luego del proceso de reparación para el caso de matrices de suelo (Figura 30(c)) muestran que los defectos intervenidos se pudieron rellenar casi por completo, aunque se evidencia la presencia de erosión debido a la inestabilidad de la propia matriz de suelo frente al contenido líquido propio de la solución enzimática. Por su parte, los resultados obtenidos luego del proceso de reparación para el caso de matrices cementicias (suelo-cemento) (Figura 31(c)) muestran que los defectos intervenidos se pudieron rellenar por completo sin la evidencia de erosión; esto es debido al cemento como estabilizador de la propia matriz.



**Figura 30.** Proceso de auto-reparación de filamentos de matrices de suelo. (a) Inmediatamente luego de intervención en filamento. (b) Posterior a 7 días de aplicación enzimática. (c) Posterior a 14 días de aplicación enzimática.

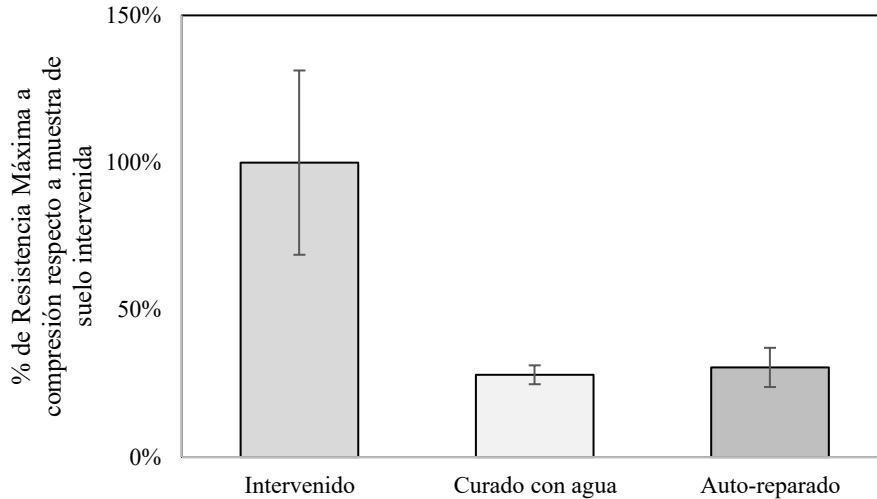


**Figura 31.** Proceso de auto-reparación de filamentos de matrices cementicias. (a) Inmediatamente luego de intervención en filamento. (b) Posterior a 7 días de aplicación enzimática. (c) Posterior a 14 días de aplicación enzimática.

La literatura describe métodos de base biológica que pueden rellenar tamaños de defecto similares pero aplicados en materiales a base de matrices de cemento mediante la aplicación de otras soluciones enzimáticas (Rosewitz et al., 2021).

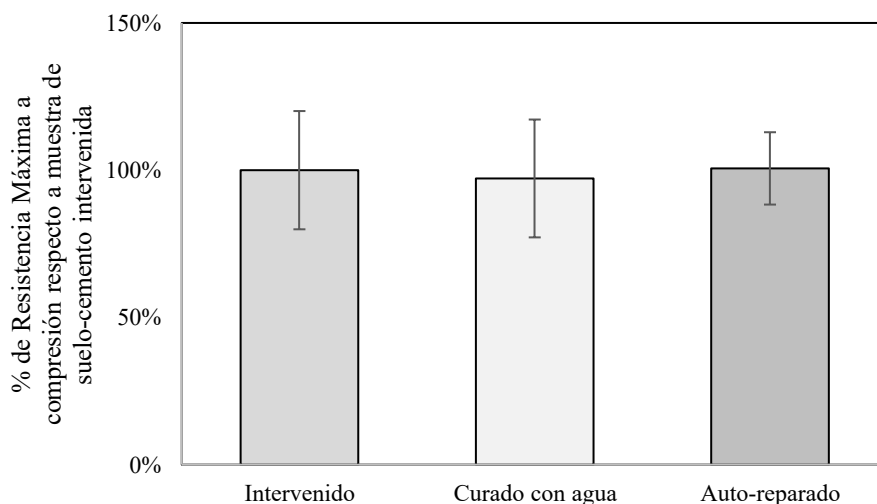
#### 4.4.2 Ensayo de compresión no confinada en muestras auto-reparadas

La Figura 32 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de compresión no confinada realizados en las muestras de matrices de suelo curadas con agua, intervenidas y auto-reparadas. Se muestran los valores en función al porcentaje de resistencia máxima a compresión respecto a la muestra intervenida. Las tensiones de compresión se obtuvieron mediante la relación entre la carga aplicada y el área transversal de las muestras impresas en 3D. La relación entre los desplazamientos registrados de la célula de carga y las alturas de la probeta cúbica se consideraron como las deformaciones para generar las curvas de tensión-deformación de compresión. Se evidencia que las muestras intervenidas presentan un mejor comportamiento en comparación con las muestras curadas con agua y las muestras auto-reparadas. Como se muestra en la Figura 32, el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las propiedades mecánicas de matrices de suelo con un nivel de resistencia a la compresión inferior con respecto a la resistencia de las muestras curadas con agua y auto-reparadas. Esto se debe esencialmente a la propia naturaleza del material a base de suelo y agua, el cual presenta erosión al aplicarse la solución enzimática directamente.



**Figura 32.** Resistencia a compresión en muestras auto-reparadas de matrices de suelo. Resistencia a la compresión de filamentos impresos en 3D de matrices de suelo. (a) Muestras intervenidas. (b) Muestras curadas con agua. (c) Muestras auto-reparadas.

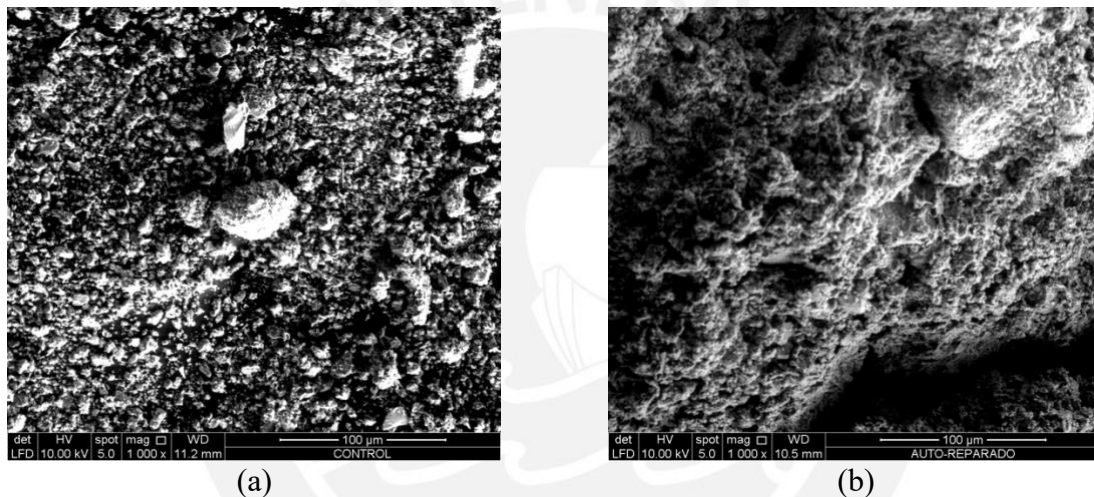
Por su parte, la Figura 33 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de compresión no confinada realizados en las muestras de matrices cementicias intervenidas, curadas con agua y auto-reparadas. Se muestran los valores en función al porcentaje de resistencia máxima a compresión respecto a la muestra intervenida. Como se muestra en la Figura 33, el uso de una solución enzimática no muestra incremento significativo en las características mecánicas de matrices cementicias, donde se alcanza un valor idéntico en resistencia a la compresión con respecto al de las muestras intervenidas.



**Figura 33.** Resistencia a compresión en muestras auto-reparadas de matrices cementicias. Resistencia a la compresión de filamentos impresos en 3D de matrices cementicias. (a) Muestras intervenidas. (b) Muestras curadas con agua. (c) Muestras auto-reparadas.

#### 4.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en muestras auto-reparadas

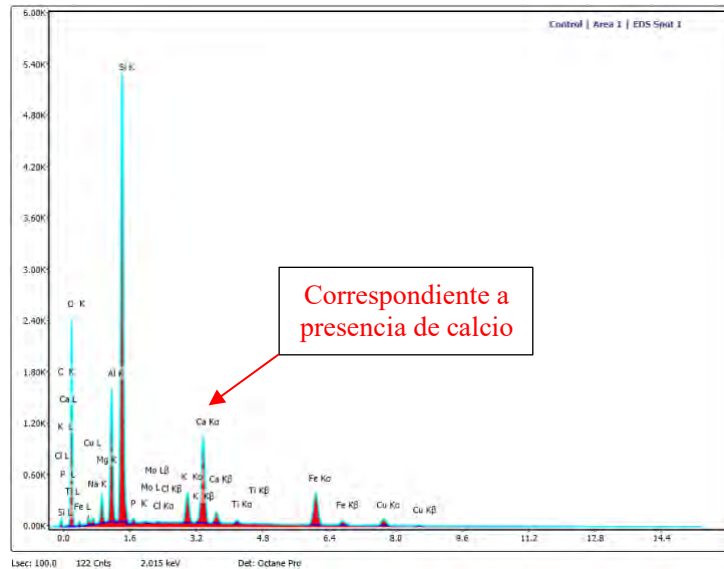
Como se aprecia en la Figura 34, las imágenes SEM muestran la unión del  $\text{CaCO}_3$  precipitado en la superficie de las muestras de matrices cementicias auto-reparadas. También verifica la capacidad de la solución enzimática para reparar grietas y taponar poros a muestras de matrices cementicias. Sólo es necesario la aplicación de pequeñas cantidades de solución enzimática para catalizar rápidamente la producción de cristales de carbonato cálcico. Se puede apreciar que la muestra auto-reparada presenta una mayor solidificación de los cristales precipitados de  $\text{CaCO}_3$ , lo cual se encuentra en concordancia con investigaciones como (Rosewitz et al., 2021) donde se verifica que al aplicar soluciones enzimáticas en matrices puramente de cemento, estas tienen la capacidad de reparar y taponar las grietas u orificios.



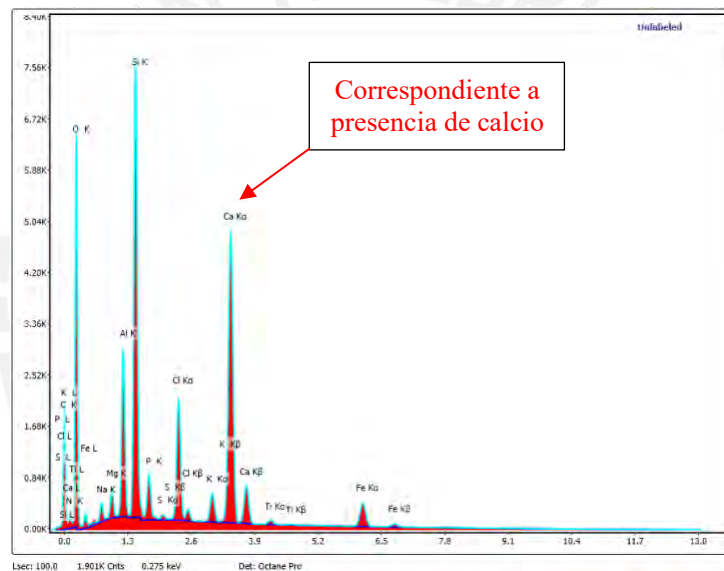
**Figura 34.** Imágenes SEM de muestras de matrices cementicias auto-reparadas. Muestras extraídas de piezas auto-reparadas. (a) Muestra de filamento control. (b) Muestra de filamento auto-reparado con solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y concentración enzimática de 5 U.

#### 4.4.4 Microscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) en muestras auto-reparadas

La Figura 35 muestra el análisis de EDS a matrices cementicias auto-reparadas, se evidente que existe un incremento significativo en la cuantificación de calcio correspondiente a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  de cada muestra. El análisis de los rayos X característicos provee información química de los elementos de la muestra (Y. Liu et al., 2022). A partir de la figura, el incremento en la cantidad de carbonato cálcico precipitado con la molaridad de la solución de  $\text{CaCl}_2$ -urea se confirma no sólo por inspección visual sino también por la proporción relativa de calcio.



(a)



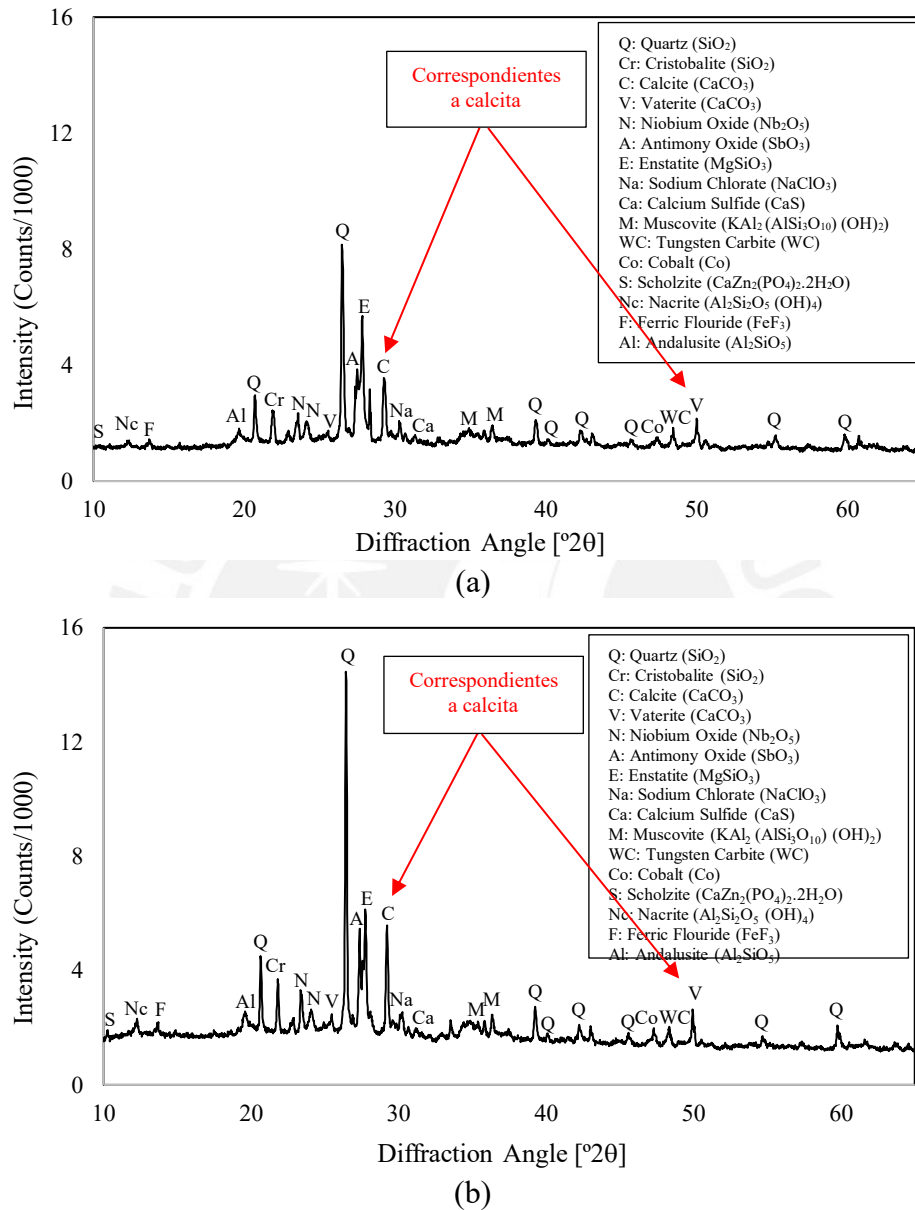
(b)

**Figura 35.** Análisis EDS de muestras de matrices cementicias auto-reparadas. Muestras extraídas de piezas auto-reparadas. (a) Muestra de filamento control. (b) Muestra de filamento auto-reparado con solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y concentración enzimática de 5 U.

#### 4.4.5 Difracción de rayos X (XRD) en muestras auto-reparadas

Cinco gramos de la superficie reparada con solución enzimática de cada muestra se molieron hasta obtener un polvo fino y se secaron al aire en el entorno del laboratorio antes de realizar un análisis de XRD. Como se muestra en la Figura 36, los resultados de los análisis XRD en todas las muestras revelaron la presencia de la composición propia del suelo: sílice ( $\text{SiO}_2$ ), alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), óxido de potasio ( $\text{K}_2\text{O}$ ), magnesia ( $\text{MgO}$ ), cal ( $\text{CaO}$ ), óxido de sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) y carbonato de calcio en forma de calcita y vaterita. Se identificó presencia de carbonato de calcio en todas las muestras, tanto en las muestras intervenidas como

en las muestras auto-reparadas; no obstante, se aprecia un incremento significativo del 40 % para calcita y del 15 % para vaterita tanto en las muestras auto-reparadas con solución enzimática en comparación con las muestras intervenidas.



**Figura 36.** Patrón de difracción de rayos X (XRD) en muestras de matrices cementicias auto-reparadas. Muestras extraídas de piezas auto-reparadas. (a) Muestra de filamento control. (b) Muestra de filamento auto-reparado con solución equimolar de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ -urea y concentración enzimática de 5 U.



## **CAPÍTULO 5. Conclusiones**



Las conclusiones de la presente tesis son abordadas en relación con diferentes aspectos. Tales como, la optimización de la precipitación de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) mediante la optimización de la concentración enzimática; la evaluación de las propiedades físicas y mecánicas del suelo modificado con solución enzimática; y la evaluación de las propiedades físicas y mecánicas de la auto-reparación de filamentos fabricados por impresión 3D.

### **5.1 Optimización de la precipitación de $\text{CaCO}_3$ mediante la optimización de la concentración enzimática**

En esta sección, se ha presentado una metodología para la optimización de la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  mediante la optimización de la solución enzimática; a partir de la variación equimolar de  $\text{CaCl}_2$ -urea y la concentración de actividad enzimática. De los datos experimentales obtenidos, se pueden extraer lo siguiente:

1. Para las variaciones de concentraciones equimolares de  $\text{CaCl}_2$ -urea evidencian que el incremento de las concentraciones no garantiza un incremento significativo en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  propiamente dicho. Las posibles causas van relacionadas a la rápida hidrólisis de la urea y la saturación de la enzima en la solución. Es recomendable utilizar variaciones de concentraciones tanto de bajo concentración como de concentraciones mayores, esto debido a la incertidumbre con respecto a la solución que presenta un mejor comportamiento. Así mismo, la presente tesis se limitó a un rango de concentraciones donde no necesariamente se encontró el pico máximo de precipitación de  $\text{CaCO}_3$  para determinadas dosificaciones. De los valores obtenidos en el análisis de espectro por FTIR podemos concluir que los precipitados obtenidos en casi su totalidad presentan lo esperado para el  $\text{CaCO}_3$ .

### **5.2 Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas del suelo estabilizado con solución enzimática**

En esta sección, se ha presentado la evaluación de las propiedades físicas y mecánicas del suelo bio-estabilizado con solución enzimática. Mediante la evaluación de durabilidad frente a la erosión por agua y ensayo de compresión no confinada. Con respecto a los datos experimentales obtenidos, se pueden extraer lo siguiente:

1. La evaluación de durabilidad frente a la erosión por agua mostró que, todas las muestras presentaron pérdidas de masa y presentaron numerosas grietas tras la inmersión en agua. No obstante, se evidencia que la mezcla de suelo modificado con  $\text{CaCl}_2$ -urea con concentración equimolar de 1M y solución enzimática de 5U, presenta una pérdida de masa de sólo el 18.35 % luego de la inmersión total por un lapso de 60 minutos. Lo cual es una pérdida relativamente pequeña en comparación con la erosión completa de la muestra en el agua en el caso de la mezcla de suelo con agua desionizada (suelo control) luego de la inmersión total, esta última en un lapso de 45 minutos. También se espera que este deterioro afecte negativamente a la resistencia y rigidez del material, aunque este aspecto en concreto no se ha evaluado en el presente trabajo.
2. Se evidencia que las muestras control presentan un mejor comportamiento en comparación con las muestras modificadas. En particular, el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las propiedades mecánicas del material con un nivel de resistencia a la compresión inferior de 35.5 % con respecto al de las muestras no estabilizadas. Las variaciones en el tiempo de curado no provocaron un incremento significativo del valor obtenido de resistencia de compresión. El aumento de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ -urea dio como resultado un aumento en la cantidad de  $\text{CaCO}_3$  precipitado; a su vez, ocasionaron un decremento del valor de resistencia a la compresión.
3. La ineficacia en la estabilización del suelo con solución enzimática puede deberse a (a) la existencia de materia orgánica propias de la cantera de donde proviene el suelo o extraña adherida a las partículas y (b) la presencia de partículas de forma irregular. La ineficacia en el tratamiento de suelos que tienen partículas recubiertas de materia orgánica se debe a la débil unión entre las partículas del suelo y los cristales de carbonato. La segunda razón es la presencia de finos en este suelo, el suelo empleado cuenta con la presencia de arcillas lo que dificulta el establecimiento de enlaces efectivos entre las partículas del suelo y los cristales de carbonato. Sin embargo, el efecto de la actividad de la enzima ureasa es diferente para distintas concentraciones de solución de  $\text{CaCl}_2$ -urea. Es mejor mantener una actividad de enzima baja para concentraciones de solución de  $\text{CaCl}_2$ -urea bajas y una actividad de enzima alta para soluciones con concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ -urea altas. Esto, para mantener la velocidad de hidrólisis de la urea y, finalmente, mantener la velocidad de precipitación del  $\text{CaCO}_3$ .

4. Las imágenes SEM muestran la unión del  $\text{CaCO}_3$  precipitado en la superficie de las partículas de suelo. Además, el polimorfo de calcita se observó claramente en todos los casos de prueba tras ampliar las imágenes SEM independientemente de la actividad de la ureasa y de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ -urea. El entrecrecimiento y los escalones pueden indicar algunas alteraciones durante el proceso de crecimiento del cristal. Las muestras de suelo modificado mostraron un incremento significativo en la presencia de  $\text{CaCO}_3$ . Según sus propiedades fisicoquímicas de superficie, la ureasa puede interactuar con la fase inorgánica en interfaz sólido/líquido y dirigir así el crecimiento de las estructuras inorgánicas. Se identifican los elementos químicos integrales y localizados presentes y se cuantificó su abundancia. Existe un incremento significativo en la cuantificación de Ca correspondiente a la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  de cada muestra.

#### **5.4 Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas de auto-reparación de filamentos fabricados con matrices empleadas en impresión 3D**

En esta sección, se ha presentado la evaluación de las propiedades físicas y mecánicas de auto-reparación de filamentos fabricados con matrices empleadas en impresión 3D. Mediante la evaluación de auto-reparación de muestras impresas intervenidas y ensayo de compresión no confinada. Con los datos experimentales obtenidos, se pueden extraer lo siguiente:

1. La evaluación de auto-reparación en las muestras impresas mediante el uso de una impresora 3D, las cuales fueron intervenidas mediante la incorporación de defectos de manera manual, manifestó que la solución enzimática puede rellenar defectos utilizando una cantidad muy pequeña de enzima. Los resultados obtenidos luego del proceso de reparación para el caso de matrices de suelo muestran que los defectos auto-reparados se pudieron rellenar casi por completo, aunque se evidencia la presencia de erosión debido a la inestabilidad de la propia matriz de suelo frente al contenido líquido propio de la solución enzimática. Por su parte, los resultados obtenidos luego del proceso de reparación para el caso de matrices cementicias muestran que los defectos auto-reparados se pudieron rellenar por completo sin la evidencia de erosión; esto es debido al cemento como estabilizador de la propia matriz

2. Los valores obtenidos de resistencia a la compresión se obtuvieron mediante la evaluación de muestras curadas con agua, intervenidas y auto-reparadas. Se evidencia que las muestras intervenidas presentan un mejor comportamiento en comparación con las muestras curadas con auto y las muestras auto-reparadas. En particular, el uso de una solución enzimática afectó negativamente a las características mecánicas de matrices de suelo con un nivel de resistencia a la compresión inferior con respecto al de las muestras no auto-reparadas. Esto se debe esencialmente a la propia naturaleza del material a base de suelo y agua, el cual presenta erosión al aplicarse la solución enzimática directamente.
3. Por su parte, los resultados obtenidos en los ensayos de compresión no confinada realizados en las muestras de matrices cementicias curadas con agua, intervenidas y auto-reparadas. No muestra incremento significativo en las propiedades mecánicas de matrices cementicias, donde se alcanza un valor idéntico en resistencia a la compresión con respecto al de las muestras intervenidas.
4. Las imágenes SEM muestran la unión del  $\text{CaCO}_3$  precipitado en la superficie de las partículas de suelo. Al igual que en las muestras de suelo estabilizadas, el polimorfo de calcita se observó claramente en todos los casos de prueba tras ampliar las imágenes SEM independientemente de la actividad de la ureasa y de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ -urea. Se puede apreciar que la muestra auto-reparada presenta una mayor solidificación de los cristales precipitados de  $\text{CaCO}_3$ .

## Referencias bibliográficas

- Afifudin, H., Hamidah, M. S., Hana, H. N., & Kamaruddin, K. (2011). Microorganism Precipitation in Enhancing Concrete Properties. *Applied Mechanics and Materials*, 99-100, 1157-1165. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.99-100.1157>
- Afrin, H. (2017). A Review on Different Types Soil Stabilization Techniques. *International Journal of Transportation Engineering and Technology*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.11648/j.ijtet.20170302.12>
- Allen, R. T. L., Edwards, S. C., & Shaw, D. N. (2014). *Repair of Concrete Structures*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482269352>
- Almajed, A., Abbas, H., Arab, M., Alsabhan, A., Hamid, W., & Al-Salloum, Y. (2020). Enzyme-Induced Carbonate Precipitation (EICP)-Based methods for ecofriendly stabilization of different types of natural sands. *Journal of Cleaner Production*, 274, 122627. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122627>
- ASTM D2166. (2005). *Standard Test Method for Unconfined Compressive Strength of Cohesive Soil*. <https://www.astm.org/d2166-06.html>
- Bahar, R., Benazzoug, M., & Kenai, S. (2004). Performance of compacted cement-stabilised soil. *Cement and Concrete Composites*, 26(7), 811-820. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2004.01.003>
- Barman, D., & Dash, S. K. (2022). Stabilization of expansive soils using chemical additives: A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, 14(4), 1319-1342. <https://doi.org/10.1016/j.jrmge.2022.02.011>
- Begum, A., Banumathi, S., Choudhary, M. I., & Betzel, C. (2012). *RCSB PDB - 4GY7: Crystallographic structure analysis of urease from Jack bean (Canavalia ensiformis) at 1.49 Å Resolution*. <https://www.rcsb.org/structure/4gy7>
- Billong, N., Melo, U. C., Louvet, F., & Njopwouo, D. (2009). Properties of compressed lateritic soil stabilized with a burnt clay–lime binder: Effect of mixture components. *Construction and Building Materials*, 23(6), 2457-2460. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2008.09.017>
- Bosch, F., Gimeno, J. V., & Moya, M. C. M. (2002). FTIR quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. Application to geological samples. *Talanta*, 58(4), 811-821. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00372-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00372-7)

- Bowers, A. R., & Huang, C. P. (1986). Adsorption characteristics of metal-EDTA complexes onto hydrous oxides. *Journal of Colloid and Interface Science*, *110*(2), 575-590. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90410-8](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90410-8)
- Burbank, M. B., Weaver, T. J., Green, T. L., Williams, B. C., & Crawford, R. L. (2011). Precipitation of Calcite by Indigenous Microorganisms to Strengthen Liquefiable Soils. *Geomicrobiology Journal*, *28*(4), 301-312. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.499929>
- Carmona, J. P. S. F., Oliveira, P. J. V., & Lemos, L. J. L. (2016). Biostabilization of a Sandy Soil Using Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation. *Procedia Engineering*, *143*, 1301-1308. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.144>
- Chahal, N., Siddique, R., & Rajor, A. (2012). Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. *Construction and Building Materials*, *28*(1), 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.07.042>
- Chen, L., Huang, L., Hua, J., Chen, Z., Wei, L., Osman, A. I., Fawzy, S., Rooney, D. W., Dong, L., & Yap, P.-S. (2023). Green construction for low-carbon cities: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *21*(3), 1627-1657. <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01544-4>
- Chen, P.-Y., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2012). Biological materials: Functional adaptations and bioinspired designs. *Progress in Materials Science*, *57*(8), 1492-1704. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.03.001>
- Chou, C.-W., Seagren, E. A., Aydilek, A. H., & Lai, M. (2011). Biocalcification of Sand through Ureolysis. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, *137*(12), 1179-1189. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000532](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000532)
- Cuccurullo, A., Gallipoli, D., Bruno, A. W., Augarde, C., Hughes, P., & La Borderie, C. (2020). Soil Stabilization Against Water Erosion via Calcite Precipitation by Plant-Derived Urease. En F. Calvetti, F. Cotecchia, A. Galli, & C. Jommi (Eds.), *Geotechnical Research for Land Protection and Development* (pp. 753-762). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21359-6\\_80](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21359-6_80)
- De Belie, N. (2016). Application of bacteria in concrete: A critical evaluation of the current status. *RILEM Technical Letters*, *1*, 56-61. <https://doi.org/10.21809/rilemtechlett.2016.14>
- De Rooij, M., Van Tittelboom, K., De Belie, N., & Schlangen, E. (Eds.). (2013). *Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials: State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee 221-SHC: Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials* (Vol. 11).

Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6624-2>

- DeJong, J. T., Martinez, B. C., Mortensen, B. M., Nelson, D. C., Waller, J. T., Weil, M. H., Ginn, T. R., Weathers, T., Barkouki, T., Fujita, Y., Redden, G., Hunt, C., Major, D., & Tanyu, B. (2009). Upscaling of bio-mediated soil improvement. En *Proceedings of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering (Volumes 1, 2, 3 and 4)* (pp. 2300-2303). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/978-1-60750-031-5-2300>
- DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., & Nelson, D. C. (2010). Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36(2), 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.029>
- Dilrukshi, R. A. N., Nakashima, K., & Kawasaki, S. (2018). Soil improvement using plant-derived urease-induced calcium carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, 58(4), 894-910. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2018.04.003>
- DIN 18945. (2018). *Earth blocks—Requirements, test and labelling*. Beuth Verlag GmbH. <https://doi.org/10.31030/2897113>
- Edvardsen, C. (1999). Water Permeability and Autogenous Healing of Cracks in Concrete. *Materials Journal*, 96(4), 448-454. <https://doi.org/10.14359/645>
- Ennaceri, H., Ishika, T., Mkpuma, V. O., & Moheimani, N. R. (2023). Microalgal biofilms: Towards a sustainable biomass production. *Algal Research*, 72, 103124. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103124>
- Firoozi, A. A., Guney Olgun, C., Firoozi, A. A., & Baghini, M. S. (2017). Fundamentals of soil stabilization. *International Journal of Geo-Engineering*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40703-017-0064-9>
- Flores, N. (2020, noviembre 28). *Corrosión en el concreto sumergido*. <https://blog.laminasyaceros.com/blog/corrosión-en-el-hormigón-sumergido>
- Galitskova, Y. M. (2021). Research of qualitative properties of soils during construction works. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1015(1), 012077. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1015/1/012077>
- Hall, M. R., Najim, K. B., & Keikhaei Dehdezi, P. (2012). 9 - Soil stabilisation and earth construction: Materials, properties and techniques. En M. R. Hall, R. Lindsay, & M. Krayenhoff (Eds.), *Modern Earth Buildings* (pp. 222-255). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857096166.2.222>
- Hurtado, D. (2017, mayo 9). *Vivir en zonas de laderas inestables es un peligro para tu familia y hogar*. EL DEBATE. <https://www.debate.com.mx/prevenir/Sal-del-peligro-y>

cuidate-de-las-laderas-inestables---20170509-0198.html

- Illanes, A. (Ed.). (2008). *Enzyme Biocatalysis*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Iqbal, D. M., Wong, L. S., & Kong, S. Y. (2021). Bio-Cementation in Construction Materials: A Review. *Materials*, *14*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ma14092175>
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., & Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, *36*(2), 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>
- Kanellopoulos, A., Giannaros, P., & Al-Tabbaa, A. (2016). The effect of varying volume fraction of microcapsules on fresh, mechanical and self-healing properties of mortars. *Construction and Building Materials*, *122*, 577-593. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.06.119>
- Kappaun, K., Piovesan, A. R., Carlini, C. R., & Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research*, *13*, 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>
- Kaur, N. P., Majhi, S., Dhama, N. K., & Mukherjee, A. (2020). Healing fine cracks in concrete with bacterial cement for an advanced non-destructive monitoring. *Construction and Building Materials*, *242*, 118151. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118151>
- Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *59*(1), 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>
- Lee, S., & Kim, J. (2020). An Experimental Study on Enzymatic-Induced Carbonate Precipitation Using Yellow Soybeans for Soil Stabilization. *KSCE Journal of Civil Engineering*, *24*(7), 2026-2037. <https://doi.org/10.1007/s12205-020-1659-9>
- Lippiatt, B. C., & Boyles, A. (2001). Building for Environmental and Economic Sustainability (BEES): Software for Selecting Cost-Effective Green Building Products. *NIST*. <https://www.nist.gov/publications/building-environmental-and-economic-sustainability-bees-software-selecting-cost>
- Liu, J., Shi, B., Jiang, H., Huang, H., Wang, G., & Kamai, T. (2011). Research on the stabilization treatment of clay slope topsoil by organic polymer soil stabilizer. *Engineering Geology*, *117*(1), 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2010.10.011>
- Liu, Y., Liu, A., Liu, S., & Kang, Y. (2022). Nano-scale mechanical properties of constituent minerals in shales investigated by combined nanoindentation statistical analyses and SEM-EDS-XRD techniques. *International Journal of Rock Mechanics and Mining*



- Sciences*, 159, 105187. <https://doi.org/10.1016/j.ijrmms.2022.105187>
- Lozano, A. L. (2012). Evolución y uso de Materiales y Sistemas Constructivos. *Revista de Arquitectura e Ingeniería*, 6(3), 1-6.
- Lv, J., Mao, J., & Ba, H. (2015). Influence of marine microorganisms on the permeability and microstructure of mortar. *Construction and Building Materials*, 77, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.11.072>
- Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., & Unno, T. (2013). Applicability of Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation as a Soil-Strengthening Technique. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 139(12), 2201-2211. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000959](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000959)
- Noguera, J. (2013). *El hormigón como soporte biológico natural y su aplicación en fachadas*. Universidad de Sevilla, Departamento de Construcciones Arquitectónicas I. <https://idus.us.es/handle/11441/40093>
- Nortcliff, S., Hulpke, H., Bannick, C. G., Terytze, K., Knoop, G., Bredemeier, M., & Schulte-Bisping, H. (2011). Soil, 1. Definition, Function, and Utilization of Soil. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. [https://doi.org/10.1002/14356007.b07\\_613.pub3](https://doi.org/10.1002/14356007.b07_613.pub3)
- Oliveira, P. J. V., Freitas, L. D., & Carmona, J. P. S. F. (2017). Effect of Soil Type on the Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation Process Used for Soil Improvement. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 29(4), 04016263. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0001804](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001804)
- Pacheco-Torgal, F., & Labrincha, J. A. (2014). Biotechnologies and bioinspired materials for the construction industry: An overview. *International Journal of Sustainable Engineering*, 7(3), 235-244. <https://doi.org/10.1080/19397038.2013.844741>
- Pandey, A., & Rabbani, A. (2017). Stabilisation of Pavement Subgrade Soil using Lime and Cement: Review. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 4, 5733-5735.
- Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V., & Bang, S. S. (2001). Remediation of Concrete Using Microorganisms. *Materials Journal*, 98(1), 3-9. <https://doi.org/10.14359/10154>
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). *Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan?* 15. <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Real, T., Real, J., Montalbán, L., & Carrión, F. (2016). *Posidonia oceanica* used as a new natural fibre to enhance the performance of asphalt mixtures. *Construction and Building Materials*, 102, 601-612. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.10.193>

- Rivera, J. F., Aguirre-Guerrero, A., Gutiérrez, R. M. de, & Orobio, A. (2020). Estabilización química de suelos—Materiales convencionales y activados alcalinamente (revisión). *Informador Técnico*, 84(2), Article 2. <https://doi.org/10.23850/22565035.2530>
- Rodríguez-Blanco, J. D., Shaw, S., & Benning, L. G. (2011). The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, viavaterite. *Nanoscale*, 3(1), 265-271. <https://doi.org/10.1039/C0NR00589D>
- Rodríguez-Jiménez, T. de J., Ojeda-Barrios, D. L., Blanco-Macias, F., Valdez-Cepeda, R. D., & Parra-Quezada, R. (2016). Urease and nickel in plant physiology. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 22(2). <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2014.11.051>
- Rosewitz, J. A., Wang, S., Scarlata, S. F., & Rahbar, N. (2021). An enzymatic self-healing cementitious material. *Applied Materials Today*, 23, 101035. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101035>
- Silva, G., Ñañez, R., Zavaleta, D., Burgos, V., Kim, S., Ruiz, G., Pando, M. A., Aguilar, R., & Nakamatsu, J. (2022). Eco-friendly additive construction: Analysis of the printability of earthen-based matrices stabilized with potato starch gel and sisal fibers. *Construction and Building Materials*, 347, 128556. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.128556>
- Toirac, J. (2004). Patología de la construcción grietas y fisuras en obras de hormigón ; origen y prevención. *Ciencia y Sociedad*, 29(1), 72-114. <https://doi.org/10.22206/cys.2004.v29i1.pp72-114>
- Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). (2012, diciembre 20). *Biological concrete for constructing «living» building materials with lichens, mosses*. ScienceDaily. <https://www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121220080310.htm>
- Valencia, Y., Camapum, J., & Lara, L. (2012). A field study on the improvement of a tropical soil with biotechnological techniques. *DYNA*, 79(173), 56-65.
- Van, L. A. (2012). Bio-Mediated Ground Improvement: From Laboratory Experiment to Pilot Applications. *Geo-Frontiers 2011: Advances in Geotechnical Engineering*, 4099-4108. [https://doi.org/10.1061/41165\(397\)419](https://doi.org/10.1061/41165(397)419)
- Wang, W.-H., Köhler, B., Cao, F.-Q., & Liu, L.-H. (2008). Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175(4), 467-477. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.018>
- Wang, Y., Konstantinou, C., Tang, S., & Chen, H. (2023). Applications of microbial-induced carbonate precipitation: A state-of-the-art review. *Biogeotechnics*, 1(1), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.bgtech.2023.100008>

- Wassie, T. A., & Demir, G. (2023). A Review on Stabilization of Soft Soils with Geopolymerization of Industrial Wastes. *International Journal of Engineering and Manufacturing (IJEM)*, 13(2), 1-8. <https://doi.org/10.5815/ijem.2023.02.01>
- Wiktor, V., & Jonkers, H. M. (2011). Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33(7), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012>
- Yepes, V. (2021, febrero 8). *Estabilización de suelos con cal – El blog de Víctor Yepes*. <https://victoryepes.blogs.upv.es/2021/02/08/estabilizacion-de-suelos-con-cal/>

