

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Thais Regina Bombarda

PLATAFORMAS 3D BASEADAS EM BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO
SUSTENTADA DE MICRORGANISMOS APLICADOS AO CONTROLE BIOLÓGICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Araraquara, SP

2026

THAÍS REGINA BOMBARDA

PLATAFORMAS 3D BASEADAS EM BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO
SUSTENTADA DE MICRORGANISMOS APLICADOS AO CONTROLE BIOLÓGICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Discente: Thais Regina Bombarda

Orientador: Hernane da Silva Barud

Coorientadora: Ana Luíza Garcia Millás Massaguer

Araraquara, SP
2026

FICHA CATALOGRÁFICA

B681p Bombarda, Thaís Regina.

Plataformas 3D baseadas em biopolímeros para liberação sustentada de microrganismos aplicados ao controle biológico/Thaís Regina Bombarda. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2026. 73f.

Dissertação(Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. Bioimpressão 3D. 2. Goma- gelana. 3. Hidrogel compósito. 4. Controle biológico. 5. Biopolímeros. I. Título.

CDU 60


THAÍS REGINA BOMBARDA

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 14 de abril de 2026

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA
Data: 18/12/2025 15:30:53-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. JOSÉ EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA
Instituto Biológico – Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade
Agropecuária – Campinas /SP

Documento assinado digitalmente
 MARIO EIDI SATO
Data: 18/12/2025 12:54:00-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. MÁRIO EIDI SATO
Instituto Biológico – Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade
Agropecuária – Campinas /SP

Dedico esse trabalho à minha mãe, Ana Regina, minha maior incentivadora, cujo amor, força e apoio incondicional tornaram cada etapa desta jornada possível.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi realizado com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – 88887.956321/2024-00).

Agradeço primeiramente a minha família, que é a base de tudo o que sou. Em especial, à minha mãe Ana Regina, minha maior incentivadora, força constante e porto seguro. E ao meu padrasto Rubens, que acompanhou de perto o início dessa conquista e hoje assiste ao fechamento deste ciclo lá do céu. Te levo comigo no coração.

Aos meus amigos do BioPolMat, que tornaram este processo mais leve, acolheram meus choros, celebraram cada conquista e compartilharam comigo os desafios e aprendizados diários. Obrigada por construírem comigo um caminho de parceria, amizade e pertencimento. Um agradecimento especial aos colegas que contribuíram com ideias para os experimentos e sugeriram melhorias sempre que necessário, auxiliando de forma decisiva no desenvolvimento deste trabalho, em especial Livia, Jhonatan, Saulo, Molíria, Arthur, Andressa, Paula, Lorena, Vitória, Maria Júlia, Francisco e Clovis. Agradeço ao professor Luiz Carlos Bertolino da UERJ por ceder uma das argilas utilizadas nesse trabalho.

Ao meu namorado, Lucas, por todo apoio, paciência e amor. Por dividir a mesa de trabalho até tarde da noite, pelo incentivo silencioso e pelas palavras certas nos dias mais difíceis. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma duvidei. A vida é mais leve ao seu lado.

À minha amiga Ariadne, que mesmo de longe sempre esteve pronta para me ouvir, ajudar, aconselhar e acolher. Sua amizade é luz e conforto em muitos momentos.

À Marina, minha amiga desde a graduação, e que eu tive a grata felicidade de reencontrar durante essa jornada. Sua coorientação foi essencial para a construção deste trabalho, mas o que mais levarei para a vida é seu exemplo de dedicação.

À Ana Luiza Garcia Millás Massaguer, que aceitou o convite para ser minha coorientadora neste trabalho, e me proporcionou treinamentos em suas impressoras 3D. Agradeço a toda a equipe da 3DBS que me recebeu tão bem em Campinas.

Ao meu orientador, Hernane, pela oportunidade oferecida, por todo o auxílio prestado e por compartilhar tão generosamente seu conhecimento. Sua orientação foi essencial para que este trabalho pudesse ser concluído. Obrigada por, desde o início, abrir tantas portas no meu caminho.

À Universidade de Araraquara pela oportunidade de concluir mais essa etapa, e à FAPESP pelo apoio em projetos do grupo. À José Eduardo Marcondes e Mario Eidi Sato, por aceitarem compor a banca avaliadora e contribuírem significativamente para o aprimoramento deste trabalho.

E a mim, deixo a seguinte frase para sempre ser lembrada: “Eu aceito as coisas boas que estão me acontecendo. Elas não são mero acaso, sei exatamente de onde elas vieram: eu que fui buscar”.

RESUMO

A bioimpressão baseada em extrusão é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada para a produção de plataformas 3D baseadas em biopolímeros. Diversos materiais vêm sendo utilizados como biotintas, entre eles os hidrogéis. Dentre os hidrogéis comumente utilizados, está a goma-gelana (GG), um polissacarídeo solúvel em água, sintetizado por bactérias, e que possui propriedades de gelificação. Porém, as características reológicas da GG podem ser melhoradas através da inserção de partículas de reforço, como por exemplo as argilas, formando assim hidrogéis nanocompósitos (HNC). Uma das possíveis aplicações destas plataformas 3D é a sua utilização como biodefensivo para a utilização em solo, através do encapsulamento de microrganismos antagonistas que desempenhem papéis como defensivos biológicos, que possam ser utilizados tanto no campo quanto nas chamadas “hortas domésticas”. Entre os microrganismos que atuam como agentes de controle biológico (ACBs) estão os fungos da espécie *Trichoderma harzianum*, um tipo de agente biodefensivo que vem sendo amplamente utilizado para a diminuição do uso de agroquímicos. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de novas formulações baseadas em bioimpressão, que garantam a viabilidade dos microrganismos encapsulados e promova a sua liberação sustentada em solo. Foram obtidas três formulações de hidrogéis compósitos (HCs) de GG/LP e três de GG/HNT. Os hidrogéis obtidos foram submetidos a ensaios reológicos, a fim de se avaliar suas propriedades de viscoelasticidade. Os resultados indicaram que os HCs GGLP e GGHNT exibiram comportamento típico de gel, com módulo de armazenamento (G') superior ao módulo de perda (G''), o que é desejável para aplicações em bioimpressão 3D. As análises de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR) confirmaram a presença dos grupos funcionais característicos da GG e das argilas, sugerindo interações na estrutura dos hidrogéis. Já a Análise Termogravimétrica (TGA) mostrou que a incorporação de LP e HNT alterou o perfil térmico das amostras, indicando interações entre a GG e as argilas, resultando em maior estabilidade térmica. Testes de viabilidade celular mostraram que as etapas de reticulação e liofilização após a bioimpressão afetaram negativamente a viabilidade dos conídios de *T. harzianum*. As formulações desenvolvidas apresentaram propriedades reológicas adequadas para a aplicação em bioimpressão 3D, resultando em plataformas com estrutura estável e comportamento viscoelástico desejável. Após a incorporação dos conídios fúngicos nos hidrogéis, estruturas contendo diferentes números de camadas (1, 4 e 8) foram bioimpressas com o objetivo de avaliar o efeito desse fator sobre a liberação dos microrganismos de matriz do hidrogel. A variação no número de camadas não impactou a capacidade germinativa de *T. harzianum*; os conídios mantiveram seu padrão característico de germinação em todas as condições avaliadas. O micélio resultante apresentou o desenvolvimento típico da espécie, com crescimento rápido, coloração inicialmente branca e posterior tonalidade verde-intensa pela esporulação, textura densa e aspecto cotonoso a finamente granuloso. Sendo assim, o presente estudo traz novas formulações baseadas em hidrogel de GG e as argilas LP e HNT com potencial aplicação na bioimpressão de *T. harzianum*, e aplicação futura em sistemas biodefensivos para uso agrícola.

Palavras-chave: bioimpressão 3D, goma-gelana, hidrogel compósito, controle biológico, biopolímeros.

ABSTRACT

Extrusion-based bioprinting is a technique that has been widely employed for the fabrication of three-dimensional platforms using biopolymer-based materials. Several materials have been used as bioinks, including hydrogels. Among the commonly used hydrogels is gellan gum (GG), a water-soluble polysaccharide synthesized by bacteria that exhibits gelation properties. However, the rheological characteristics of GG can be improved by incorporating reinforcing particles, such as clays, thus forming nanocomposite hydrogels (HNCs). One potential application of these 3D platforms is their use as biocontrol agents in soil through the encapsulation of antagonistic microorganisms that act as biological pesticides and can be applied both in agricultural fields and in so-called “home gardens”. Among the microorganisms that function as biological control agents (BCAs) are fungi of the species *Trichoderma harzianum*, a type of biopesticide that has been widely used to reduce the reliance on agrochemicals. Therefore, the aim of the present work is the development of new bioprinting-based formulations capable of ensuring the viability of encapsulated microorganisms while promoting their sustained release in soil. Three composite hydrogel (CH) formulations of GG/LP and three of GG/HNT were obtained. The resulting hydrogels were subjected to rheological analyses to evaluate their viscoelastic properties. The results indicated that both GGLP and GGHNT CHs exhibited typical gel-like behavior, with storage modulus (G') values higher than loss modulus (G''), which is desirable for 3D bioprinting applications. Vibrational Spectroscopy in the Infrared Region (FT-IR) confirmed the presence of characteristic functional groups of GG and the clays, suggesting interactions within the hydrogel structure. Thermogravimetric Analysis (TGA) showed that the incorporation of LP and HNT altered the thermal profile of the samples, indicating interactions between GG and the clays that resulted in improved thermal stability. Cell viability assays showed that the crosslinking and lyophilization steps following bioprinting negatively affected the viability of *T. harzianum* conidia. The developed formulations exhibited rheological properties suitable for 3D bioprinting, resulting in platforms with stable structures and desirable viscoelastic behavior. After incorporating the fungal conidia into the hydrogels, structures containing different numbers of layers (1, 4, and 8) were bioprinted to assess the effect of this parameter on microorganism release from the hydrogel matrix. Variation in the number of layers did not affect the germination capacity of *T. harzianum*; the conidia maintained their characteristic germination pattern under all evaluated conditions. The resulting mycelium exhibited the typical development of the species, with rapid growth, initially white coloration transitioning to an intense green due to sporulation, a dense texture, and a cottony to finely granular appearance. Thus, the present study introduces new GG-based hydrogel formulations containing LP and HNT with potential application in the bioprinting of *T. harzianum*, and future use in biodefensive systems for agricultural applications.

Keywords: 3D bioprinting, gellan gum, composite hydrogel, biological control, biopolymers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vantagens do CB em relação aos agroquímicos convencionais.....	14
Figura 2. Processos utilizados pelos fungos do gênero <i>Trichoderma</i> durante sua atuação como ACB	16
Figura 3. Classificação dos biopolímeros	18
Figura 4. Estrutura química da goma gelana: (a) HAGG e (b) LAGG	19
Figura 5. Mecanismo de gelificação da GG. A GG transita de uma forma aleatória para uma estrutura de dupla hélice, seguido pela formação de uma rede ramificada que dá origem ao hidrogel	20
Figura 6. Principais propriedades dos argilominerais, como liberação sustentada, modificação reológica, atoxicidade e ampla disponibilidade, que tornam esses materiais adequados para diversas aplicações em áreas como a indústria farmacêutica, biotecnologia, medicina e meio ambiente.....	22
Figura 7. Estrutura da LP, evidenciando seu formato discoide com cargas negativas na superfície das plaquetas e positiva nas bordas, além da composição química das lamelas	23
Figura 8. Esquema de formação do castelo de cartas a partir da organização dos discos de LP em meio aquoso.	24
Figura 9. Estrutura química da HNT, evidenciando sua estrutura tubular e as cargas positivas no lúmen interno, e negativas na superfície externa	25
Figura 10. Esquema ilustrativo dos componentes de uma biotinta, incluindo células e microrganismos, biopolímeros e agentes de reforço, como argilas, nanopartículas e nanotubos. Após sua formulação, a biotinta é utilizada no processo de bioimpressão 3D, uma tecnologia explorada para a fabricação de tecidos cartilagosos, fibras musculares, órgãos e válvulas cardíacas personalizadas, replicando a complexidade estrutural e funcional das válvulas naturais. Além disso, a bioimpressão 3D apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novas formulações destinadas ao encapsulamento de ACBs para aplicações agrícolas, que foi o foco deste trabalho.	27
Figura 11. Figura representativa de uma plataforma de agricultura vertical, evidenciando a presença de luz controlada, bem como a presença de um sistema de irrigação.....	29
Figura 12. Imagem ilustrativa do passo a passo do desenvolvimento do HC GGLP.....	31
Figura 13. Imagem ilustrativa do passo a passo do desenvolvimento do HC GGHNT.....	32
Figura 14. Esquema do processo de diluição seriada (à esquerda) e imagem ilustrativa da câmara de Neubauer (à direita). Para a realização da contagem dos conídios, foram considerados os 16 quadrados representados pelo número 2, totalizando 64 quadrados da câmara completa	35

Figura 15. HCs contendo LP (acima) e HCs contendo HNT (abaixo), e suas respectivas concentrações.....	37
Figura 16. a) Reograma de teste de varredura de amplitude a 25 °C das amostras dos HCs GGLP. a) valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 2,5% (rosa), demonstrando as LVEs (linhas tracejadas). b) valores de G' e G'' das três concentrações de HCs, mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados)	39
Figura 17. a) Reograma de teste de varredura de amplitude a 25 °C das amostras dos HCs GGHNT. a) valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde) e GG 3% - HNT 1,5% (vinho), demonstrando as LVEs (linhas tracejadas). b) valores de G' e G'' das três concentrações de HCs, mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados)	39
Figura 18. Curvas de varredura de frequência a 25 °C das amostras dos HCs GGLP. a) GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 2,5% (rosa), mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados)	41
Figura 19. Curvas de varredura de frequência a 25 °C das amostras dos HCs GGHNT. a) valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde) e GG 3% - HNT 1,5% (vinho), mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados)	42
Figura 20. Curvas de viscosidade a 25 °C das amostras dos HCs GGLP, mostrando valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro)LP pura (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 2,5% (rosa).	44
Figura 21. Curvas de viscosidade a 25 °C das amostras dos HCs GGHNT, mostrando valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde) e GG 3% - HNT 1,5% (vinho)	45
Figura 22. Curva TG dos HCs GGLP. As curvas apresentam o resultado das amostras LP - PURA (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja), LP 5% - GG 2,5% (cor-de-rosa) e GG 3% - PURA (amarelo escuro)	46
Figura 23. Cuvas TG dos HCs GGHNT. As curvas apresentam os resultados de HNT - PURA (rosa claro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (azul), GG 3% - HNT 1,5% (vermelho) e GG 3% - PURA (amarelo escuro)	47
Figura 24. Espectros de FT-IR de GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 2,5% (rosa), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 1,5% (azul)	49
Figura 25. Espectros de FT-IR de GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde), GG 3% - HNT ,5% (vermelho) e HNT pura (rosa)	51
Figura 26. Imagens geradas pelo <i>software</i> de impressão Slic3r do objeto modelo a ser impresso, e a prévia da impressão dado pelo programa	53

Figura 27. As figuras de a) a i) correspondem aos HCs GGLP, sendo a), b) e c) a concentração de LP 5% - GG 1,5%, d), e) e f) LP 5% - GG 2,0% e g), h) e i) LP 5% - GG 2,5%. As figuras a), d) e g) são referentes ao momento em que o hidrogel sai pelo bico da seringa, b), e) e h) correspondem ao hidrogel logo após a impressão, e c), f) e i) mostram o momento após a reticulação. Já as figuras de j) a r) correspondem aos HCs GGHNT, sendo j), k) e l) a concentração de GG 3% - HNT 0,5%, m), n) e o) GG 3% - HNT 1,0%, e p), q) e r) GG 3% - HNT 1,5%. As figuras j), m) e p) são referentes ao momento em que o hidrogel sai pelo bico da seringa, k), n) e q) correspondem ao hidrogel logo após a impressão, e l), o) e r) mostram o momento após a reticulação 54

Figura 28. Incorporação dos conídios de *Trichoderma harzianum* às três concentrações distintas de cada tipo de HC. Observa-se que macroscopicamente há uma homogeneidade da distribuição dos conídios nas formulações, etapa essencial para a posterior avaliação da viabilidade fúngica 55

Figura 29. Amostras do HC LP 5% - GG 2,5% contendo conídios de *Trichoderma harzianum* antes (à esquerda) e após (à direita) o processo de liofilização. As amostras foram previamente submetidas à impressão manual, visando à obtenção de estruturas para os testes de viabilidade fúngica 56

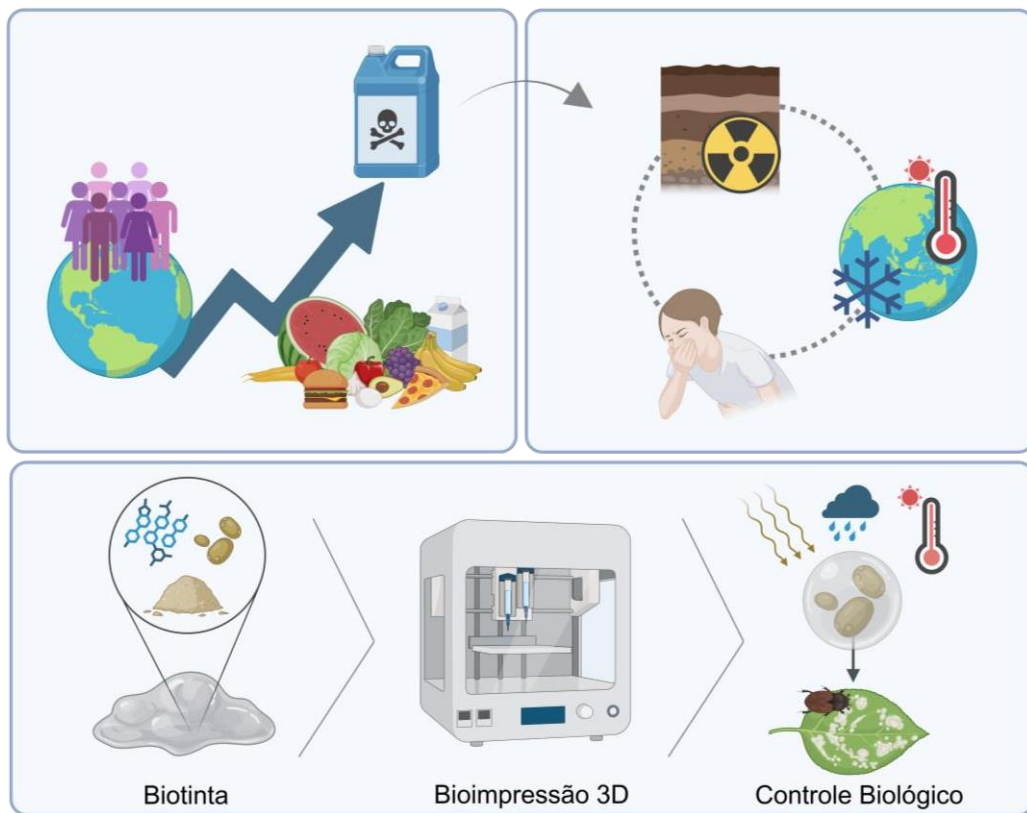
Figura 30. Hidrogéis GGLP contendo *T. harzianum* impressos em 1, 4 e 8 camadas, dispostos sobre meio de cultivo ágar batata após serem submetidos à reticulação com solução de cloreto de cálcio 0,1M. As amostras foram avaliadas no D1, D3, D5 e D7..... 60

Figura 31. Hidrogéis GGHNT contendo *T. harzianum* impressos em 1, 4 e 8 camadas, dispostos sobre meio de cultivo ágar batata após serem submetidos à reticulação com solução de cloreto de cálcio 0,1M. As amostras foram avaliadas no D1, D3, D5 e D7..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composições das formulações de hidrogéis à base de GG e LP. As concentrações finais estão expressas em porcentagem (m/m) de cada componente na formulação	30
Tabela 2. Composições das formulações de hidrogéis à base de GG e HNT. As concentrações finais estão expressas em porcentagem (m/m) de cada componente na formulação.....	32
Tabela 3. Etapas de perda de massa dos materiais GG pura, LP pura e compósitos GGLP mostrando o intervalo de temperatura e a porcentagem de perda de massa.....	47
Tabela 4. Etapas de perda de massa dos materiais GG pura, LP pura e compósitos GGLP mostrando o intervalo de temperatura e a porcentagem de perda de massa	48
Tabela 5. Representação das principais bandas atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de GG e LP puras, e dos compósitos GGLP	50
Tabela 6. Representação das principais bandas atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de GG e HNT puras, e dos compósitos GGHNT	52
Tabela 7. Concentração de conídios fúngicos viáveis após incorporação aos HCs selecionados, frente aos quatro tipos de preparações distintas	57

RESUMO GRÁFICO



SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Controle Biológico de Pragas.....	13
1.1.1.	<i>Trichoderma sp</i>	13
1.2.	Formulações Naturais para Controle Biológico.....	17
1.2.1.	Biopolímeros.....	17
1.2.1.1.	Goma gelana.....	19
1.2.1.2.	Argilas.....	221
1.3.	Bioimpressão 3D.....	26
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1.	Objetivos Gerais.....	299
2.2.	Objetivos Específicos.....	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1.	Materiais.....	30
3.2.	Preparo dos Hidrogéis.....	30
3.2.1.	Hidrogéis compósitos de GGLP.....	30
3.2.2.	Hidrogéis compósitos de GGHNT.....	31
3.3.	Determinação das propriedades reológicas e propriedades físico-químicas.....	33
3.4.	Impressão 3D dos hidrogéis compósitos de GGLP e GGHNT.....	33
3.5.	Incorporação de <i>Trichoderma harzianum</i> nos HCs.....	34
3.6.	Ensaio de printabilidade por método manual e testes de viabilidade fúngica.....	34
3.7.	Impressão dos <i>scaffolds</i> de GGLP e GGHNT contendo <i>T. harzianum</i>	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1.	Biocompósitos baseados em GGLP e GGHNT.....	36
4.2.	Reologia.....	37
4.2.1.	Varreduras de Amplitude.....	38
4.2.2.	Varreduras de Frequência.....	40
4.2.3.	Ensaio de Viscosidade Complexa.....	43
4.3.	Análise Termogravimétrica.....	45
4.4.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	49
4.5.	Impressão dos <i>scaffolds</i> de GGLP e GGHNT.....	52
4.6.	Incorporação de <i>Trichoderma harzianum</i> nos HCs.....	55
4.7.	Teste de viabilidade celular fúngica.....	57
4.8.	Impressão dos <i>scaffolds</i> de GGLP e GGHNT contendo <i>T. harzianum</i> e avaliação da liberação fúngica.....	59
5.	CONCLUSÃO.....	63
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Controle Biológico de Pragas

Devido à necessidade de produção em larga escala, pesticidas vêm sendo amplamente utilizados na agricultura por sua importância na redução da disseminação de patógenos. No entanto, o uso indiscriminado desses produtos químicos está diretamente associado à degradação do solo, à contaminação ambiental, a alterações climáticas, além de danos à saúde humana. Uma alternativa para a diminuição ao uso dos pesticidas é através do uso de biopesticidas, que aparecem como uma solução promissora para o controle de pragas na agricultura, visando melhorar o equilíbrio do ecossistema e diminuir os danos ambientais (VANDENBERGHE *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2012).

Os biopesticidas são produtos que podem ser compostos por microrganismos vivos, como bactérias, fungos e vírus, conhecidos como agentes de controle biológico (ACBs), ou extratos derivados de organismos e plantas, que atuam especificamente contra pragas causadoras de danos à agricultura. Além disso, eles geralmente não apresentam efeitos adversos sobre as plantas ou o meio ambiente (AYAZ *et al.*, 2024). Diferentemente dos pesticidas químicos, os biopesticidas apresentam características estruturais e mecanismos de ação únicos. Enquanto os pesticidas químicos são produtos sintéticos, os biopesticidas são obtidos a partir de recursos naturais, muitas vezes com o suporte de biotecnologia para potencializar sua eficácia (MEENA & MISHRA, 2020).

Segundo dados divulgados pela Embrapa, o Brasil é líder mundial no uso de controle biológico nas lavouras, com mais de 23 milhões de hectares manejados dessa forma (EMBRAPA, 2020). Em 2018, a produção de bioinsumos no país cresceu mais de 70%, movimentando R\$ 464,5 milhões e superando o crescimento do mercado internacional. Essa expansão reflete a busca por alternativas aos agroquímicos, visando à redução dos riscos à saúde humana e ao meio ambiente (BRASIL, 2019). A Figura 1 mostra algumas das vantagens do CB em relação aos agroquímicos.



Figura 1. Vantagens do CB em relação aos agroquímicos convencionais. Fonte: autoria própria.

De maneira mais detalhada, os ACBs atuam principalmente por meio da produção e liberação de metabólitos com propriedades antimicrobianas, como lipopeptídeos, bacteriocinas, antibióticos, biossurfactantes e enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular de patógenos. Compostos voláteis também podem ser produzidos, inibindo diretamente o crescimento e a atividade metabólica de microrganismos fitopatogênicos (BONATERRA *et al.*, 2022).

Além disso, os ACBs podem interferir no sistema de detecção de quorum (quórum sensing, QS), mecanismo essencial a resistência dos patógenos, seja degradando enzimaticamente ou inibindo a produção de moléculas sinalizadoras utilizadas para o início de infecções. Um exemplo disso é a produção de inibidores de QS, como lactonases, pectinases e quitinases, que inibem a síntese de moléculas sinalizadoras responsáveis por essa comunicação, dificultando a infecção e a severidade das doenças nas plantas (KALIA *et al.*, 2019). Adicionalmente, os ACBs são capazes de promover o crescimento da planta, aumentando a absorção de minerais e água ou produzindo compostos estimulantes do crescimento, como hormônios, e, assim, fortalecendo-as contra o estresse biótico e abiótico (KÖHL, KOLNAAR & RAVENSBERG, 2019; BONATERRA *et al.*, 2022).

A implementação dos ACBs na agricultura ainda é limitada em comparação com pesticidas químicos sintéticos, devido a fatores como custos de produção, baixa estabilidade durante o armazenamento, vulnerabilidade às condições ambientais e variabilidade da eficácia no campo. Contudo, avanços na formulação têm demonstrado sucesso em mitigar esses

desafios, contribuindo para o aumento e a manutenção da atividade dos biopesticidas (SAMADA & TAMBUNAN, 2020).

Atualmente, fungos do gênero *Trichoderma*, especialmente a espécie *Trichoderma harzianum*, figuram entre os ACBs amplamente utilizados no controle biológico de pragas e doenças agrícolas, devido à sua eficácia comprovada e versatilidade em diferentes culturas (NASCIMENTO *et al.*, 2022; LANNA FILHO, FERRO & MONTEIRO, 2010).

1.1.1. *Trichoderma sp.*

Os fungos do gênero *Trichoderma* são fungos filamentosos que apresentam grandes sucesso como ACBs devido à sua alta capacidade reprodutiva, capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis, efetividade no controle/morte de fungos fitopatogênicos, eficiência na promoção do crescimento de plantas, além de exibirem variabilidade em relação à atividade de biocontrole e à sua adaptabilidade ecológica e ambiental (SILVA, 2000; CHET, INBAR & HADAR, 1997). No Brasil existem mais de 200 biofungicidas à base de *Trichoderma* amplamente aplicados em culturas como soja, algodão, milho, feijão, morango, frutas cítricas, cana-de-açúcar, café, hortaliças, plantas ornamentais, frutas e espécies florestais (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019).

Algumas espécies, como *T. harzianum* e *T. viride* provaram ser bons antagonistas contra alguns patógenos de plantas transmitidos pelo solo, como *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotium spp.*, *Fusarium spp.* e *Pythium spp.* (ZHANG *et al.*, 2017), além de apresentarem eficácia no controle de nematoides, como nematoides das galhas do gênero *Meloidogyne spp.*, e nematoides de cisto do gênero *Globodera sp.* (TARIQJAVEED *et al.*, 2021). Em relação a sua atuação como ACB, esses fungos podem exercer o biocontrole indiretamente, modificando as condições ambientais, competindo por espaço e nutrientes, inativando enzimas do patógeno e produzindo antibióticos (processo chamado antibiose), ou diretamente, mediante o micoparasitismo (BENÍTEZ *et al.*, 2004, AIT-LAHSEN *et al.*, 2001).

A antibiose é definida como a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (STADNIK & BETTIOL, 2000). Dentre as substâncias que podem ser sintetizadas, muitas espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos, como por exemplo proteases, enzimas hidrolíticas, quinases, peroxidases, gliotoxinas, etc (MACHADO *et al.*, 2012).

O micoparasitismo é o modo de ação que mais se destaca, devido ao grande número de etapas envolvidas nesse processo. O *Trichoderma* atua crescendo em direção aos fungos patogênicos, enrolando suas hifas nesse microrganismo e degradando sua parede celular através da liberação de enzimas líticas chamadas quitinases, que quebram as ligações glicosídicas da quitina (um dos principais componentes da parede celular dos fungos), limitando assim o crescimento e a viabilidade do fitopatógeno (LOC *et al.*, 2019). Sendo assim, a ação das enzimas hidrolíticas sobre os fitopatógenos é considerado o principal mecanismo capaz de inibir a propagação destas pragas (MACHADO *et al.*, 2012). A Figura 2 ilustra alguns processos utilizados pelos fungos do gênero *Trichoderma* em sua atuação como ACB.

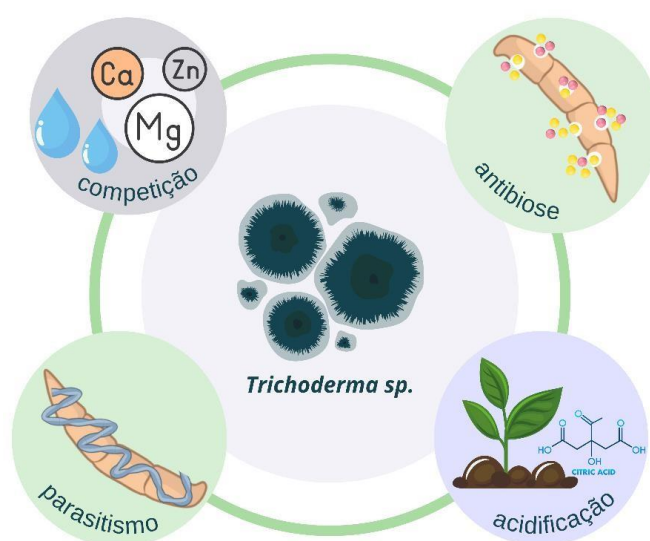


Figura 2. Processos utilizados pelos fungos do gênero *Trichoderma* durante sua atuação como ACB. Fonte: própria autoria.

Além da bioatividade contra fungos patogênicos, os fungos do gênero *Trichoderma sp.* também trazem diversos benefícios para as plantas, como a melhora no crescimento e desenvolvimento das raízes das plantas, aumentando a produtividade das culturas e a resistência a estresses abióticos, além do aumento da absorção e utilização de nutrientes. A produtividade das culturas nos campos pode aumentar até 300% após a adição de algumas espécies de *Trichoderma sp.* Em experimentos realizados em estufas, também houve um aumento considerável na produtividade quando as sementes das plantas foram previamente tratadas com esporos de *Trichoderma sp.* (BENITEZ *et al.*, 2004).

Outro mecanismo benéfico dos fungos pertencentes a esse gênero, trata-se de sua capacidade de acidificar o ambiente circundante, secretando ácidos orgânicos, como ácido glucônico, cítrico ou fumárico. Esses ácidos resultam do metabolismo de outras fontes de

carbono, principalmente glicose, e, por sua vez, são capazes de solubilizar fosfatos, micronutrientes e cátions minerais, incluindo ferro, manganês e magnésio. Portanto, a adição de *Trichoderma sp.* em solos onde os minerais são escassos, promove a biofertilização por solubilização dos mesmos e aumento na produtividade das culturas (HARMAN *et al.*, 2004).

As espécies do gênero *Trichoderma* são amplamente reconhecidas por sua versatilidade funcional, destacando-se como ACBs. Entretanto, essas espécies enfrentam desafios semelhantes aos observados em outros ACBs, especialmente relacionados aos processos de armazenamento e aplicação, que exercem influência decisiva sobre sua eficácia no campo. Diferentemente dos insumos químicos, cuja funcionalidade independe de aspectos biológicos, os ACBs necessitam manter-se viáveis — isto é, devem permanecer metabolicamente ativos ou capazes de se replicar no ambiente-alvo para garantir o desempenho desejado (SHARMA *et al.*, 2014).

A manutenção da viabilidade desses microrganismos é condicionada por uma série de fatores físico-químicos, como temperatura, umidade e pH, além de influências biológicas, incluindo mutações aleatórias induzidas por estresses metabólitos. Tais condições adversas podem comprometer a capacidade de expressão das atividades benéficas dos microrganismos, como a supressão de fitopatógenos e a promoção do crescimento vegetal. Para mitigar esses desafios, os veículos de transporte e entrega dos ACBs devem ser cuidadosamente planejados, visando proteger os microrganismos contra fatores ambientais adversos e assegurar sua funcionalidade no momento da aplicação (COSTA *et al.*, 2019; GLARE *et al.*, 2012; NGUYEN VAN LONG *et al.*, 2017).

Para superar essas limitações, torna-se essencial o desenvolvimento de formulações inovadoras que assegurem a proteção e viabilidade dos agentes biológicos. Nesse contexto, o emprego de polímeros de origem natural mostra-se promissor ao atuar como uma barreira protetora contra estresses ambientais, além de potencializar a eficiência na aplicação em campo.

1.2. Formulações Naturais para Controle Biológico

1.2.1. Biopolímeros

Polímeros oriundos da síntese de organismos vivos, seja microrganismos, animais ou plantas são intitulados biopolímeros. Em comparação aos polímeros derivados de combustíveis fósseis, os biopolímeros apresentam vantagens significativas, como biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade. Essas características os tornam candidatos promissores para uma ampla variedade de aplicações, especialmente nos setores médico, farmacêutico e agrícola

(SIVAKANTHAN *et al.*, 2020). A biodegradabilidade dos biopolímeros está associada à presença de grupos funcionais contendo oxigênio e nitrogênio em sua estrutura, os quais facilitam a ação de microrganismos e enzimas em ambientes naturais. Durante o processo de biodegradação, que depende de fatores como temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio e presença de microrganismos específicos, esses materiais são gradualmente convertidos em dióxido de carbono (CO₂), água, biomassa e outros subprodutos não tóxicos (DAS, 2023). Os polímeros em geral são classificados de acordo com sua origem, em dois principais grupos, conforme demonstrado na Figura 3.

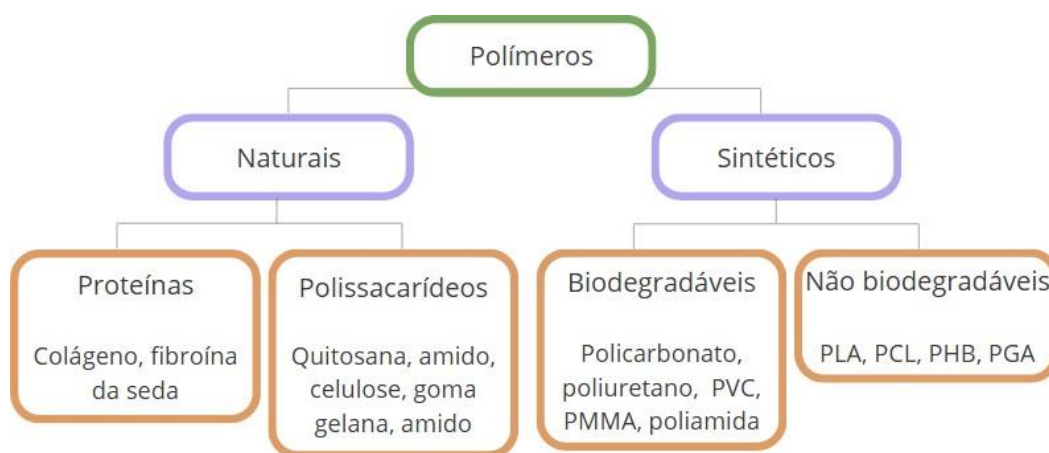


Figura 3. Classificação dos biopolímeros. Fonte: adaptado de Das *et al.* (2023).

A síntese dos biopolímeros envolve, geralmente, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, e que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). Dentre esses biopolímeros, os exopolissacarídeos microbianos têm ganhado destaque para as indústrias química, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Isso se deve às suas propriedades favoráveis de processamento, estabilidade e funcionalidade, além de sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e potencial biorreabsorvível, que os tornam alternativas ambientalmente mais sustentáveis em comparação aos polímeros sintéticos (YILDIZ & KARATAS, 2018).

Entre os biopolímeros produzidos a partir dos exopolissacarídeos microbianos, a goma gelana (GG) vem se destacando diante de suas propriedades versáteis, além de ser um material de baixo custo, estabilidade química e elevada reprodutibilidade entre lotes (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

1.2.1.1. Goma gelana

A GG é um exopolissacarídeo aniônico linear com carga negativa, de natureza biocompatível e não tóxica, composta por unidades repetidas de tetrassacarídeos compreendendo monômeros de β -*D*-glicose, um de ácido β -*D*-glicurônico e um de α -*L*-ramnose nas razões molares 2:1:1, conforme observado na Figura 4. A GG é um produto de fermentação microbiana produzida pela bactéria *Sphingomonas elodea* (anteriormente classificada como *Pseudomonas*), que vive na alga *Elodea canadensis* (BACELAR *et al.*, 2016).

A GG pode ser obtida em diferentes formas estruturais, dependendo das condições empregadas durante o processo de fermentação, especialmente no que diz respeito à manutenção ou remoção dos grupos acil. Na forma de alta acilação (*High Acyl Gellan Gum* – HAGG), obtida sob condições fermentativas mais brandas, os grupos acil são majoritariamente preservados, resultando em uma estrutura que contém dois substituintes principais: um grupo acetato na posição C-6 e um grupo glicerato na posição C-3 de uma das unidades de glicose da cadeia polissacarídica (VILLARREAL-OTALVARO & COBURN, 2021). Por outro lado, quando a GG é submetida a tratamento alcalino em temperaturas mais elevadas durante ou após a fermentação, ocorre a remoção desses substituintes, originando a forma de baixa acilação (*Low Acyl Gellan Gum* – LAGG), que apresenta um teor menor ou a completa ausência de grupos acil (FIALHO *et al.*, 2008).

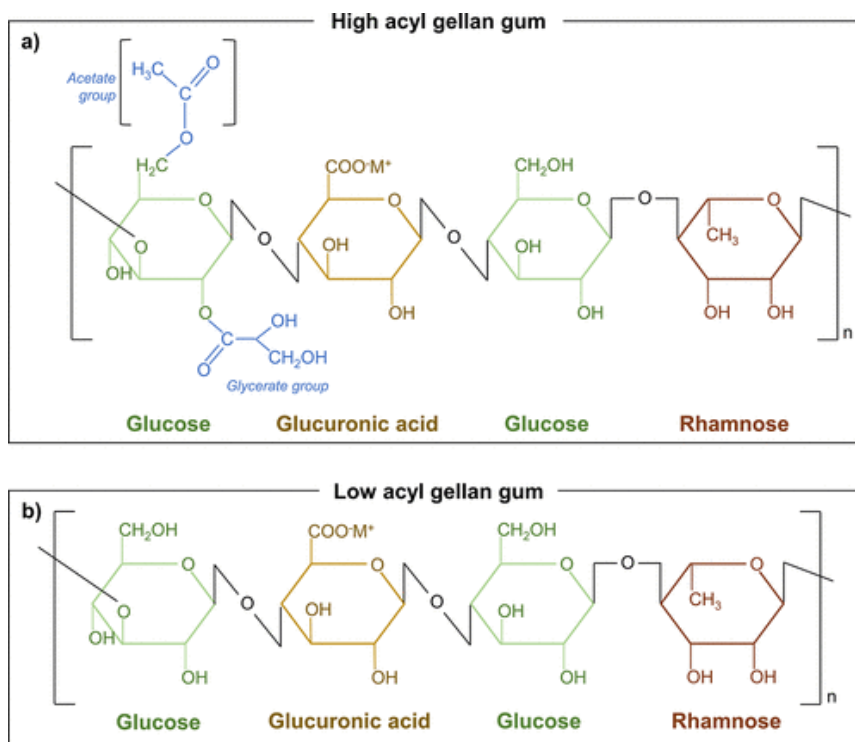


Figura 4. Estrutura química da GG: (a) HAGG e (b) LAGG. Fonte: VILLARREAL-OTALVARO & COBURN, 2021.

Em temperaturas elevadas, a GG adota uma estrutura de fita simples, reduzindo significativamente a viscosidade da solução. Durante o resfriamento, ocorre a transição para cadeias em dupla hélice, que se agregam e se conectam, formando zonas de junção, conforme demonstrado na Figura 5. Ambas as formas do polissacarídeo formam géis termorreversíveis com propriedades mecânicas distintas. Esse rearranjo ocorre por meio de interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre as cadeias paralelas (GOMES *et al.*, 2023).

Essas duplas hélices são capazes de se agregarem e se conectarem, formando zonas de junção durante a transição conformacional ao serem resfriadas abaixo de 30–50 °C. A repulsão entre hélices é reduzida na presença de cátions ou em pH baixo, resultando na formação de uma rede ramificada (VILLARREAL-OTALVARO & COBURN, 2021). Interações secundárias, como ligações de hidrogênio, unem as cadeias poliméricas, formando zonas de junção adjacentes. (MATSUKAWA & WATANABE, 2007). À medida que a temperatura diminui abaixo do ponto de gelificação, mais cadeias se concentram nessas zonas, ocorrendo a agregação das duplas hélices e formando uma extensa rede molecular capaz de aprisionar moléculas de água, que culminam na estrutura de um gel (BACELAR *et al.*, 2016).

A Figura 5 representa o processo da formação de hidrogel a partir das mudanças de temperatura na qual a GG é submetida.

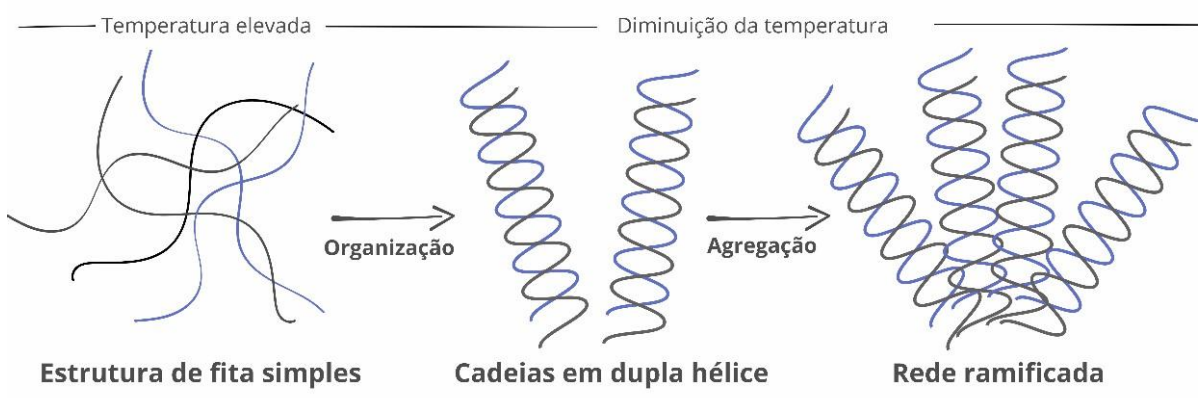


Figura 5. Mecanismo de gelificação da GG. A GG transita de uma forma aleatória para uma estrutura de dupla hélice, seguido pela formação de uma rede ramificada que dá origem ao hidrogel. Fonte: própria autoria.

As principais características da GG incluem sua capacidade de formar géis termorreversíveis a baixas concentrações, elevada solubilidade em água e estabilidade em uma ampla faixa de pH. Essas propriedades são atribuídas à sua estrutura linear e à presença de grupos carboxílicos, que permitem a formação de redes tridimensionais por interações iônicas, especialmente na presença de cátions como cálcio. Além disso, a GG apresenta excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo não tóxica e facilmente metabolizada por

microrganismos. A GG é uma escolha promissora para diversas aplicações, incluindo sistemas de liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e como excipiente farmacêutico. Sua versatilidade também é aproveitada nas indústrias alimentícia e cosmética, onde é utilizada como estabilizante, emulsificante e espessante em produtos como gelatinas, sobremesas, cremes e géis (MUTHUKUMAR, SONG & KHANG, 2019; OSMAŁEK, FROELICH & TASAREK, 2014).

Estudos demonstram que as propriedades mecânicas da GG podem ser aprimoradas de duas maneiras: 1) através do uso de agentes físicos e/ou químicos que promovam a reticulação do material, como demonstrado na metacrilização com glicidil e anidrido metacrílico (ADROVER *et al.*, 2019); 2) pela combinação da GG com materiais inorgânicos e/ou biopolímeros com baixa rigidez, formando compósitos baseados em GG (MUTHUKUMAR, SONG & KHANG, 2019). Esse processo resulta em materiais com propriedades físicas otimizadas, superando as limitações do biopolímero *in natura* (SABADINI *et al.*, 2023).

Compósitos de GG podem ser desenvolvidos através da adição de uma gama de materiais, como por exemplo hidroxapatita, vidro bioativo, fibroína de seda, entre outros. Dentre esses materiais, destacam-se os argilominerais, como a laponita (LP), uma argila sintética, e os nanotubos de haloisita (HNTs), uma argila natural. Esses argilominerais têm sido amplamente utilizados na produção de nanocompósitos (NC) baseados em hidrogéis (YANG *et al.*, 2011). As partículas de argila podem ser distribuídas uniformemente na matriz polimérica, além de atuarem como reforço e agentes de reticulação durante a formação do gel (ADROVER *et al.*, 2019).

Um desafio significativo relacionado aos géis é a dificuldade em proporcionar uma liberação sustentada dos agentes terapêuticos incorporados em suas estruturas. Isso ocorre porque, na maioria dos sistemas, a liberação dos agentes é rápida e inicial, especialmente devido à rede porosa e hidratada que compõe a estrutura do gel, a qual facilita a liberação das moléculas encapsuladas (VIGATA *et al.*, 2020). Para resolver essa limitação, a inserção de partículas de reforço, como argilas, tem se mostrado uma estratégia eficaz para otimizar e prolongar a liberação controlada dos agentes encapsulados (STEALEY, GAHARWAR & ZUSTIAK, 2023).

1.2.1.2. Argilas

As argilas e os argilominerais têm sido utilizados pela humanidade desde os primórdios da história. Tanto em sua forma natural quanto modificada, esses materiais desempenham um papel fundamental em diversas aplicações, devido à sua disponibilidade de obtenção, baixo

custo, estabilidade química, reatividade controlada e baixo impacto ambiental. As argilas são materiais naturais compostos predominantemente por diferentes argilominerais, cuja composição e grau de pureza podem variar consideravelmente, influenciando suas propriedades e áreas de aplicação (KALENOVA *et al.*, 2024).

Os argilominerais são constituintes naturais das argilas, compostos principalmente por silicatos de alumínio hidratados, com magnésio, ferro, cálcio, potássio ou sódio presentes como elementos essenciais, organizados em camadas alternadas e sobrepostas. Esses materiais são particularmente versáteis devido à sua elevada capacidade de troca iônica, elevada área superficial, capacidade de intumescimento, e partículas em escala de poucos micrômetros, características que os tornam altamente eficazes em processos de adsorção e troca iônica. Além disso, sua estrutura lamelar favorece a interação com uma variedade de materiais. Sua não abrasividade, estabilidade química e facilidade de modificação tornam os argilominerais adequados para diversas aplicações, incluindo o desenvolvimento de materiais avançados e soluções sustentáveis em áreas como biorremediação e tratamento de efluentes (MORAES *et al.*, 2017).). A Figura 6 evidencia algumas de suas principais propriedades.



Figura 6. Principais propriedades dos argilominerais, como liberação sustentada, modificação reológica, atoxicidade e ampla disponibilidade, que tornam esses materiais adequados para diversas aplicações em áreas como a indústria farmacêutica, biotecnologia, medicina e meio ambiente. Fonte: própria autoria.

As argilas vêm sendo amplamente utilizadas na produção de hidrogéis compósitos (HCs), devido a sua capacidade de melhorar as características reológicas quando combinadas com biopolímeros. Alguns tipos de argilas, como caulim, bentonita, vermiculita, LP e HNT

apresentam variações significativas em sua composição e estrutura cristalina, resultando em diferenças em suas propriedades físicas e químicas, incluindo tamanho de partícula, composição química, área de superfície, viscosidade, absorção e adsorção. Em diversas aplicações, esses minerais podem ser modificados para aprimorar suas características mecânicas, térmicas, estruturais ou funcionais (KALEDOVA *et al.*, 2024). Entre os tipos de argilas utilizados com essa finalidade, estão a LP e a HNT (SANTO *et al.*, 2022; STEALEY, GAHARWAR & ZUSTIAK, 2023).

A LP é uma argila sintética pertencente à família das esmectitas, composta por um nanosilicato bidimensional (2D), cujas partículas possuem formato discoide, com aproximadamente 1 nm de espessura e 25 nm de diâmetro. Sua estrutura é do tipo 2:1 Tetraédrica-Octaédrica-Tetraédrica (TOT), composta por duas folhas tetraédricas contendo unidades estruturais de silicato — cada uma formada por um átomo central de silício covalentemente ligado a quatro átomos de oxigênio, com geometria tridimensional tetraédrica (SiO_4), posicionadas acima e abaixo de uma folha octaédrica composta por unidades de $[\text{MgO}_4(\text{OH})_2]$. Essas camadas são ligadas por meio do compartilhamento de oxigênios comuns, conferindo à estrutura estabilidade e características físico-químicas que favorecem sua aplicação em sistemas coloidais e nanocompósitos avançados, conforme ilustrado na Figura 7. Substituições parciais de átomos de Mg^{2+} por átomos de Li^+ resultam em uma carga negativa nas superfícies das suas lamelas, enquanto suas bordas exibem cargas positivas devido à presença de cátions intercalados. Nesse contexto, os íons da Na^+ atuam no equilíbrio das cargas, através da acomodação no espaço interlamelar (DÁVILA E DÁVILA, 2017).

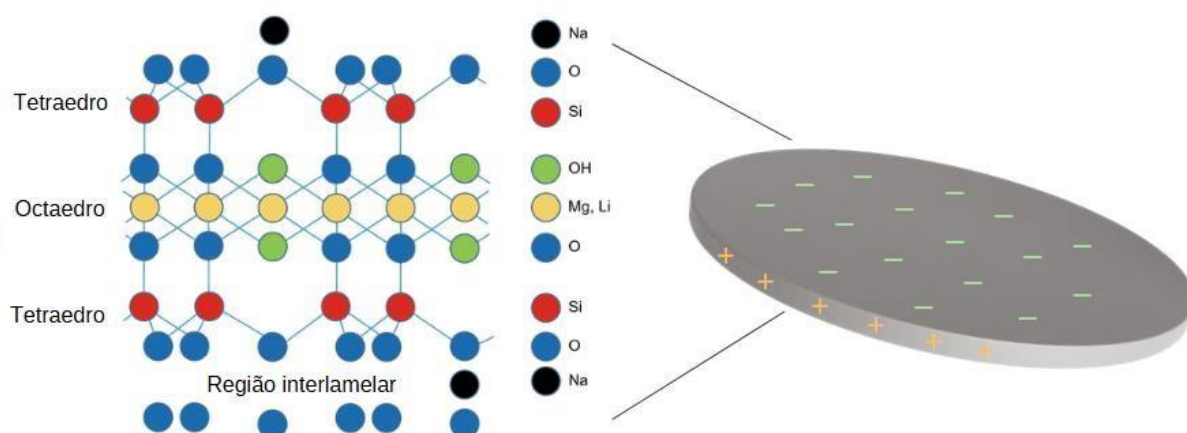


Figura 7. Estrutura da LP, evidenciando seu formato discoide com cargas negativas na superfície das plaquetas e positiva nas bordas, além da composição química das lamelas. Fonte: adaptado de Huang *et al.* (2022).

Devido às suas características morfológicas, a LP melhora as interações com moléculas catiônicas, aniônicas ou neutras. A combinação entre a área superficial e a carga também resulta na liberação sustentada de agentes terapêuticos. Como a LP é altamente hidrofílica, pode interagir facilmente com uma variedade de hidrogéis poliméricos (STEALEY, GAHARWAR & ZUSTIAK, 2023). Foi demonstrado que a LP melhora a tenacidade mecânica e controla a elasticidade, resistência à tração, rigidez e propriedades de intumescimento dos HNC (PACELLI *et al.*, 2016).

Quando a LP é dispersa em meio aquoso, íons Na^+ são liberados, resultando em um desequilíbrio de cargas. Como consequência, as faces das lamelas, carregadas negativamente, interagem eletrostaticamente com suas bordas, que possuem cargas positivas. Esse fenômeno leva à formação de uma microestrutura do tipo “castelo de cartas”, conforme ilustrado na Figura 8. Essa microestrutura é responsável tanto pelo aumento da viscosidade quanto pelo comportamento de afinamento por cisalhamento das dispersões aquosas de LP (LIU & BHATIA, 2015).

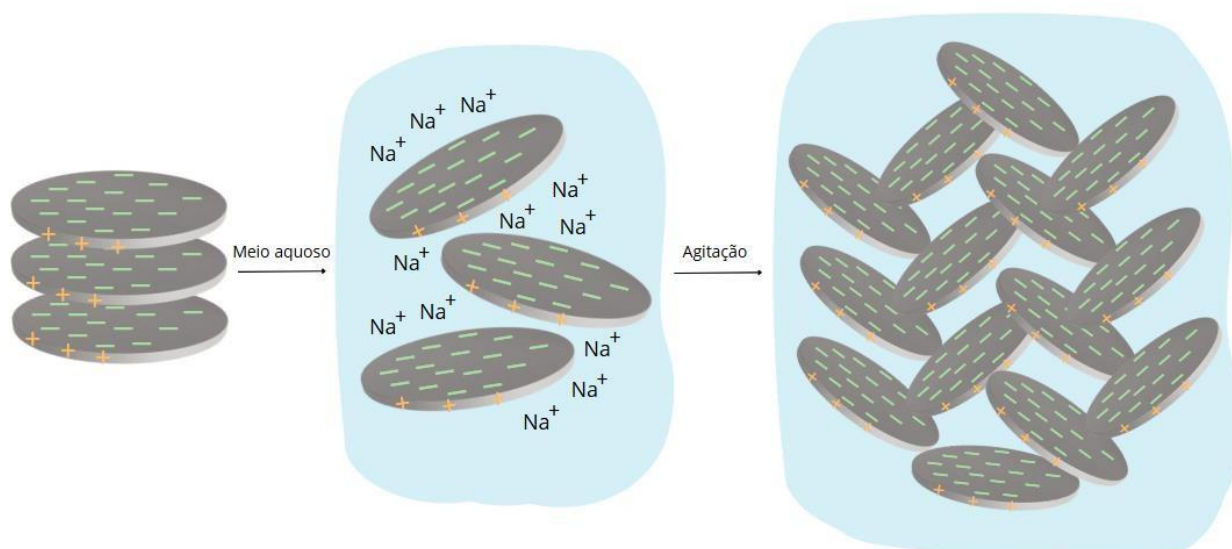


Figura 8. Esquema de formação do castelo de cartas a partir da organização dos discos de LP em meio aquoso. Fonte: própria autoria.

Outra argila que vem sendo amplamente empregada na modificação das propriedades de hidrogéis é a HNT. Esse material é um aluminossilicato pertencente ao grupo do caulim, caracterizado predominantemente por sua morfologia tubular oca, contendo uma monocamada intercalada de moléculas de água entre duas camadas duplas de alumina-sílica adjacentes, sendo composta pela fórmula química $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (SETTER & SEGAL, 2020). Classificada como um mineral de argila dioctaédrico 1:1, a HNT é comumente encontrada em solos, especialmente em regiões tropicais e subtropicais úmidas (DARAIE *et al.*, 2021).

A HNT apresenta uma estrutura nanotubular característica, com comprimento variando entre 600 e 900 nm, diâmetro externo em torno de 50 nm e diâmetro interno aproximado de 15 nm. Sua morfologia tubular resulta do enrolamento helicoidal das folhas de caulinita, um aluminossilicato em camadas, formando entre 15 a 20 lamelas concêntricas que compõem a parede do nanotubo. O interior do nanotubo (lúmen) é revestido por alumina com carga positiva, enquanto a superfície externa, composta por sílica, apresenta carga negativa, como ilustrado na Figura 9. Essa distribuição de cargas opostas entre o interior e o exterior do tubo contribui para suas propriedades físico-químicas únicas (SANTOS *et al.*, 2018). Além da sua ampla disponibilidade, a HNT é biocompatível e apresenta excelentes propriedades mecânicas. Estudos relataram a estabilidade a longo prazo e a não toxicidade dessa argila (KAMBLE, GHAG & GAIKAWAD, 2012). Além disso, o lúmen mesoporoso da HNT poderia contribuir para uma liberação sustentada de agentes terapêuticos (BONIFACIO *et al.*, 2017).

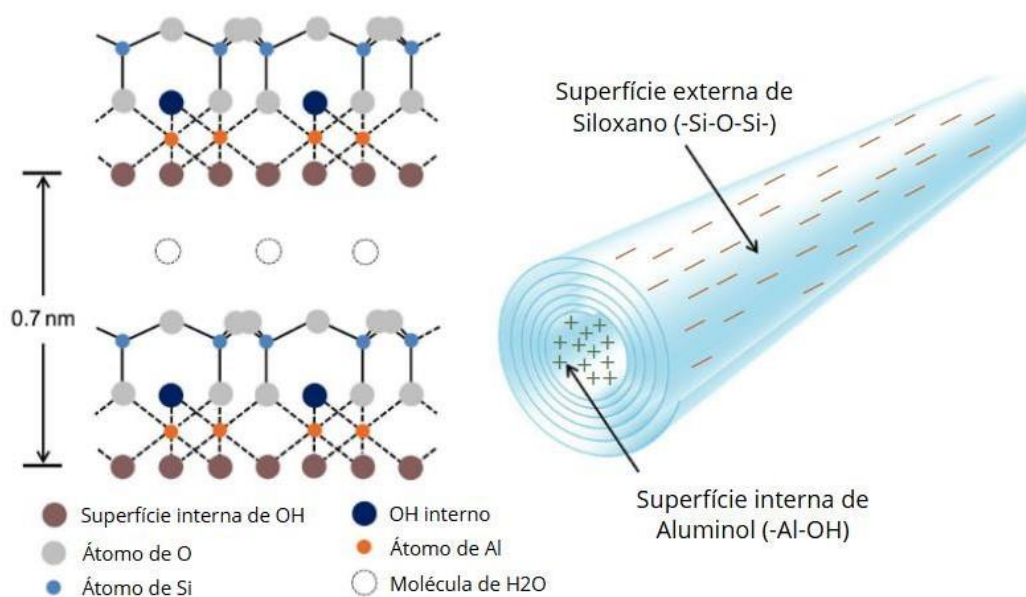


Figura 9. Estrutura química da HNT, evidenciando sua estrutura tubular e as cargas positivas no lúmen interno, e negativas na superfície externa. Fonte: adaptado de Durgut, Çinar & Ozdemir (2023).

Em comparação com o caulim, a bentonita e a montmorilonita, os nanotubos de HNTs apresentam uma dispersão mais eficiente como partículas individuais em água ou polímeros polares. Esse comportamento se deve ao seu potencial zeta negativo, que favorece a formação de dispersões estáveis em líquidos biológicos aquosos (SANTOS *et al.*, 2018). Devido à sua elevada razão de aspecto e dimensões na escala nanométrica, os HNTs apresentam um relevante potencial como materiais de reforço para diversos polímeros. A modificação das interações interfaciais entre os HNTs e a matriz polimérica pode ser realizada por meio de estratégias

químicas ou físicas, permitindo uma melhor compatibilização. Além disso, os HNTs contribuem para a melhoria das propriedades mecânicas dos polímeros, possibilitando o aumento simultâneo da resistência, do módulo de elasticidade, da rigidez e da resistência ao impacto dos polímeros, tornando-os materiais mais robustos e versáteis para aplicações avançadas (FERRARI, ARAÚJO & PIANARO, 2017).

Uma das principais finalidades da incorporação de argilas a biopolímeros é a melhoria das propriedades físico-químicas do material, especialmente para aplicações em impressão 3D. A presença dessas argilas contribui para o ajuste da viscosidade e o aumento da capacidade de extrusão, favorecendo a fidelidade estrutural e o desempenho dos suportes (templates) produzidos por essa técnica (STEALEY, GAHARWAR & ZUSTIAK, 2023).

1.3. Bioimpressão 3D

A bioimpressão tridimensional (3D) é uma técnica de fabricação que utiliza diferentes materiais biológicos, incluindo células, microrganismos, biomoléculas e matrizes miméticas a matriz extracelular (MEC) para a fabricação de estruturas 3D. A produção dessas estruturas é feita “camada por camada”, de modo que uma camada de biotinta é impressa e solidificada antes que a próxima seja depositada. Para serem aplicáveis a bioimpressão 3D, as biotintas, são constituídas de componentes baseados em hidrogéis que fornecem um ambiente promissor para o crescimento celular e que frequentemente são utilizados como matriz para bioimpressão (ZENNIFER *et al.*, 2022; HERZOG *et al.*, 2024).

As biotintas devem ser cuidadosamente projetadas e formuladas para apresentar características reológicas adequadas, como viscosidade e viscoelasticidade, além de propriedades mecânicas que permitam a deposição precisa, a integridade estrutural e a funcionalidade das estruturas impressas. Características como reticulação instantânea, e facilidade de processabilidade/moldagem são importantes parâmetros a serem considerados durante a seleção dos materiais que irão compor a biotinta (ZENNIFER *et al.*, 2022).

Os avanços atuais na bioimpressão 3D têm se concentrado no desenvolvimento de biomateriais e compósitos com propriedades mecânicas adequadas para facilitar o processo de deposição controlada por diferentes tecnologias de impressão. O objetivo é reduzir a força necessária para a deposição do material, de modo a preservar a viabilidade e a integridade das células vivas incorporadas à biotinta ao longo do processo de impressão (CAI *et al.*, 2022). A Figura 10 ilustra o princípio de funcionamento da bioimpressão 3D, os principais componentes

das biotintas e suas aplicações potenciais, destacando, inclusive, a aplicação proposta neste trabalho.

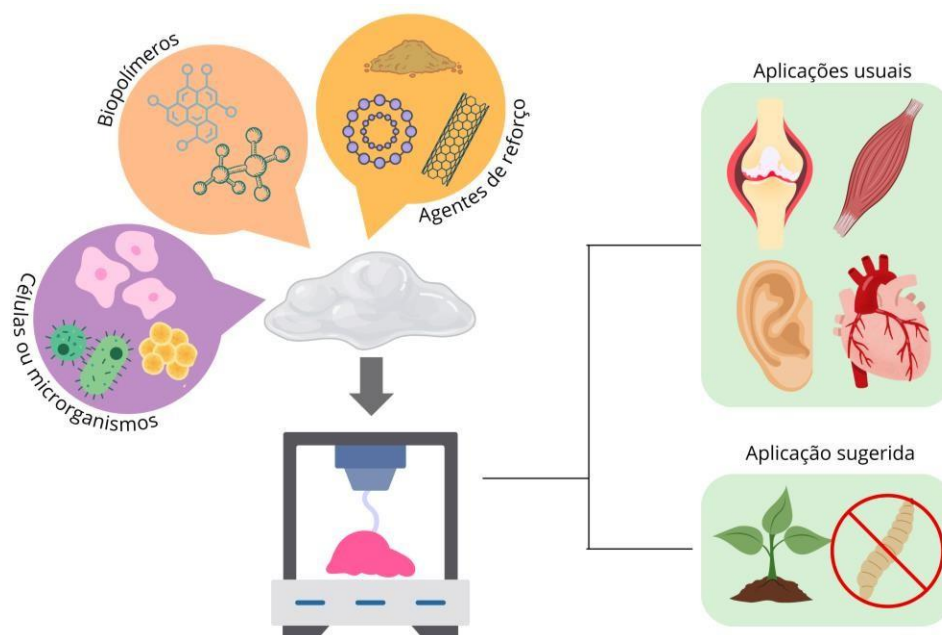


Figura 10. Esquema ilustrativo dos componentes de uma biotinta, incluindo células e microrganismos, biopolímeros e agentes de reforço, como argilas, nanopartículas e nanotubos. Após sua formulação, a biotinta é utilizada no processo de bioimpressão 3D, uma tecnologia explorada para a fabricação de tecidos cartilagosos, fibras musculares, órgãos e válvulas cardíacas personalizadas, replicando a complexidade estrutural e funcional das válvulas naturais. Além disso, a bioimpressão 3D apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novas formulações destinadas ao encapsulamento de ACBs para aplicações agrícolas, que foi o foco deste trabalho. Fonte: própria autoria.

Diversas tecnologias de bioimpressão 3D foram desenvolvidas, entre elas: jato de tinta, baseada em extrusão, jato de tinta de gotículas, estereolitografia e bioimpressão assistida por laser. Dentre elas, a baseada em extrusão vem sendo uma das abordagens mais utilizadas devido à sua versatilidade, simplicidade, preço mais acessível e capacidade de produzir *scaffolds* personalizados. Esse tipo de bioimpressão utiliza a força de extrusão gerada pneumaticamente ou mecanicamente para depositar biotintas de acordo com um design pré-determinado. Um de seus principais benefícios é a compatibilidade com diversos biomateriais, como hidrogéis e esferóides teciduais (CAI *et al.*, 2022; YANLI *et al.*, 2022).

A bioimpressão 3D tem emergido como uma tecnologia promissora não apenas na medicina regenerativa, mas também em aplicações inovadoras envolvendo o cultivo e a funcionalização de microrganismos vivos. Essa abordagem permite a deposição espacialmente controlada de microrganismos, como bactérias e fungos, em matrizes tridimensionais,

possibilitando o desenvolvimento de materiais vivos com funções específicas (WANGPRASEURT *et al.*, 2022).

Essa tecnologia oferece um potencial inédito para o desenvolvimento de bioinsumos e agentes de biocontrole mais eficazes e sustentáveis, ao permitir o encapsulamento e a liberação controlada de microrganismos benéficos. No contexto da agricultura, por exemplo, a bioimpressão pode ser aplicada na formulação de scaffolds contendo microrganismos promotores de crescimento vegetal ou antagonistas de fitopatógenos, aumentando sua viabilidade, estabilidade e eficácia para diferentes cultivares (WANGPRASEURT *et al.*, 2022; KABIR *et al.*, 2022). Além disso, estruturas bioimpressas contendo microrganismos podem ser empregadas em biocatálise, biorremediação e produção de metabólitos de interesse industrial, ampliando as fronteiras da biofabricação e contribuindo para soluções sustentáveis em diversos setores (HERZOG *et al.*, 2024).

Apesar dos avanços recentes na bioimpressão de materiais vivos, ainda são escassos na literatura estudos que explorem a biofabricação de estruturas tridimensionais utilizando GG em associação com diferentes argilominerais, como LP e HNT, como matrizes para o encapsulamento e manutenção da viabilidade de fungos entomopatogênicos, em especial os do gênero *Trichoderma*. Diante das propriedades físico-químicas e biológicas promissoras da GG e argilas – como atoxicidade, estabilidade reológica, interação iônica e controle de liberação –, o presente trabalho propôs investigar a bioimpressão de compósitos funcionais capazes de suportar o crescimento e viabilidade de *Trichoderma*, além de caracterizar físico-química e biologicamente os materiais gerados. Com isso, visou-se validar sua potencial aplicação como bioinsumo agrícola, principalmente voltado para a agricultura vertical.

A agricultura vertical é sistema inovador de cultivo que se baseia na produção de alimentos em camadas verticais, geralmente integradas a ambientes internos com controle rigoroso de fatores como luz, temperatura, umidade e nutrientes (TEO & YU, 2024). O esquema de funcionamento da agricultura vertical pode ser observado na Figura 11. Segundo dados da Forbes, a esse novo método de agricultura tem viabilizado uma nova dinâmica na cadeia de fornecimento de alimentos, redefinindo os paradigmas da agricultura tradicional e demonstrando expressivo crescimento econômico (SILVA *et al.*, 2024). Em 2021, o mercado global de agricultura vertical foi avaliado em US\$ 3,47 bilhões, alcançando US\$ 4,16 bilhões em 2022, com projeções que indicam um faturamento de aproximadamente US\$ 20,9 bilhões até 2029, evidenciando seu potencial como setor estratégico para o futuro da produção sustentável de alimentos (FORBES, 2022).



Figura 11. Figura representativa de uma plataforma de agricultura vertical, evidenciando a presença de luz controlada, bem como a presença de um sistema de irrigação. Fonte: própria autoria.

Para isso, foram desenvolvidos e testados compósitos GGLP e GGHNT, cuja adição dos argilominerais buscou otimizar propriedades mecânicas e reológicas, visando à obtenção de estruturas bioimpressas com desempenho superior na encapsulação e liberação controlada dos microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Desenvolver hidrogéis compósitos (HCs) de goma gelana/laponita (GGLP) e goma gelana/haloisita (GGHNT) contendo *Trichoderma harzianum*, impressos por técnica de impressão 3D, visando seu uso como plataformas multifuncionais para a encapsulação e liberação controlada de agentes biocidas.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes concentrações de GG, LP e HNT para a obtenção de HCs.
- Avaliar e validar as estruturas 3D baseadas em HCs de GGLP e GGHNT utilizando a técnica de bioimpressão por extrusão;

- Avaliar as propriedades reológicas, morfológicas, físico-químicas e biológicas dos HCs antes e após a impressão 3D com e sem microrganismos;
- Avaliar a viabilidade dos microrganismos incorporados aos HCs, por meio da análise de sobrevivência/viabilidade celular em condições *in vitro*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A GG com baixo grau de acetilação (LAGG), foi cedida pela empresa Disproquima Life Science Products. A argila LP da marca BYK® foi cedida pela empresa Colormix Especialidades, enquanto a HNT foi cedida pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Bertolino da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Os fungos do gênero *Trichoderma harzianum* foram cedidos pelo Instituto Biológico de Campinas (IB).

3.2. Preparo dos hidrogéis

Foram preparados dois tipos de HCs: um contendo LP e GG e um contendo HNT e GG, conforme descrito a seguir.

3.2.1. Hidrogéis compósitos de GGLP

Para o preparo dos hidrogéis a base de GGLP, a concentração de LP foi fixada em 5% (m/m), e as concentrações de GG variaram entre 0,5% e 5,0%, conforme mostrado na tabela abaixo.

Tabela 1. Composições das formulações de hidrogéis à base de GG e LP. As concentrações finais estão expressas em percentagem (m/m) de cada componente na formulação.

LP (em gramas)	GG (em gramas)	Volume de Água (em mL)	Concentração Final (em %)
0,50	0,05	9,45	LP 5% - GG 0,5%
0,50	0,10	9,40	LP 5% - GG 1,0%
0,50	0,15	9,35	LP 5% - GG 1,5%
0,50	0,20	9,30	LP 5% - GG 2,0%
0,50	0,25	9,25	LP 5% - GG 2,5%
0,50	0,30	9,20	LP 5% - GG 3,0%
0,50	0,40	9,10	LP 5% - GG 4,0%

0,50	0,50	9,00	LP 5% - GG 5,0%
------	------	------	-----------------

O preparo inicial consistiu na obtenção de uma suspensão de LP, utilizando água destilada como diluente, conforme observado na Figura 12.

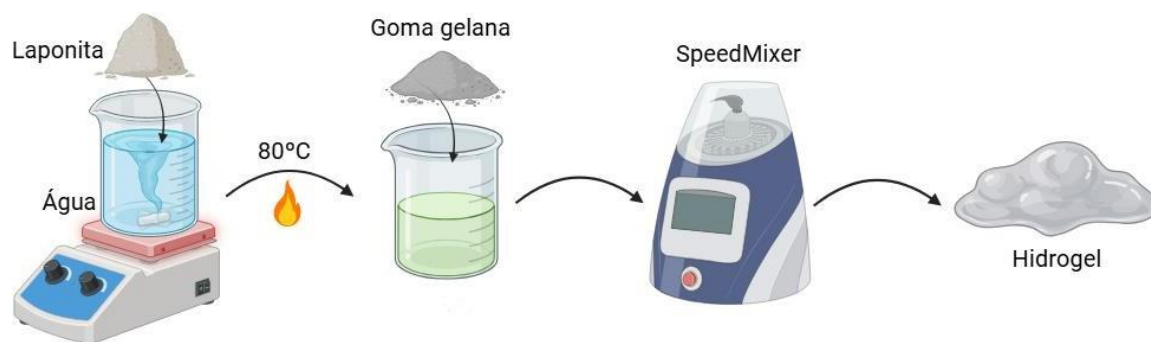


Figura 12. Imagem ilustrativa do passo a passo do desenvolvimento do HC GGLP. Fonte: própria autoria.

A água destilada foi adicionada em um recipiente e submetida à agitação em um agitador magnético a 400 rpm, enquanto a LP foi adicionada gradualmente, mantendo-se a agitação por 3 minutos. Posteriormente, visando uma melhor homogeneização da GG, a suspensão de LP foi aquecida em banho-maria a 80 °C por 10 minutos. Por fim, a GG foi incorporada, e a suspensão foi levada ao equipamento SpeedMixer por 5 minutos a 3500 rpm, garantindo a completa homogeneização do hidrogel. Foram feitas análises de reologia de todas as concentrações de hidrogéis produzidas, com o objetivo de identificar aquelas com características ideais para aplicação em bioimpressão 3D. Com base nos resultados obtidos, foram selecionadas as três concentrações mais adequadas para dar seguimento às análises: LP 5% - GG 1,5%, LP 5% - GG 2,0% e LP 5% - GG 2,5%.

3.2.2. Hidrogéis compósitos de GGHNT

Para o desenvolvimento dos hidrogéis a base de GGHNT, a concentração de GG foi fixada em 3% (m/m), e as concentrações de HNT variaram entre 0,5% e 2,0%, conforme mostrado na tabela abaixo.

Tabela 2. Composições das formulações de hidrogéis à base de GG e HNT. As concentrações finais estão expressas em porcentagem (m/m) de cada componente na formulação.

GG (em gramas)	HNT (em gramas)	Volume de Água (em mL)	Concentração Final (em %)
0,30	0,03	9,67	GG 3% - HNT 0,3%
0,30	0,05	9,65	GG 3% - HNT 0,5%
0,30	0,10	9,60	GG 3% - HNT 1,0%
0,30	0,15	9,55	GG 3% - HNT 1,5%
0,30	0,20	9,50	GG 3% - HNT 2,0%
0,30	0,25	9,45	GG 3% - HNT 2,5%

O preparo inicial consistiu na obtenção de uma suspensão de HNT e GG, utilizando água destilada como diluente, conforme observado na Figura 13.

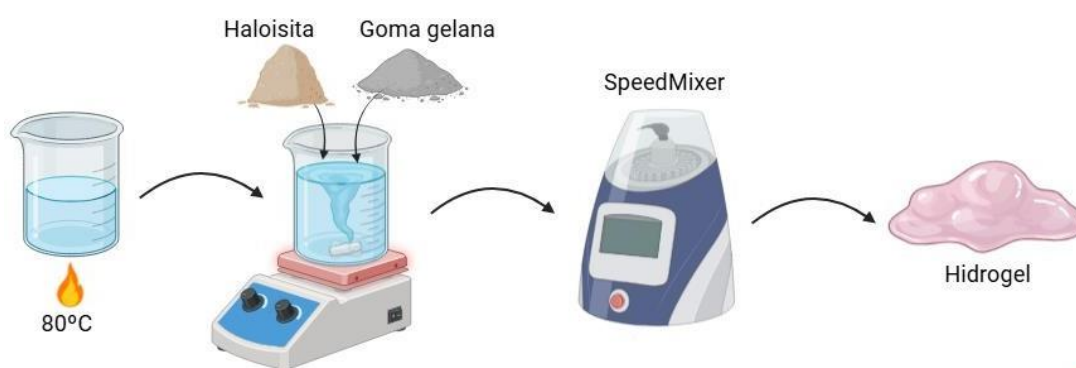


Figura 13. Imagem ilustrativa do passo a passo do desenvolvimento do HC GGHNT. Fonte: própria autoria.

Primeiramente, a água destilada foi aquecida em banho-maria a 80 °C por 10 minutos, visando melhorar a homogeneização da HNT e da GG. Em seguida, foi levada ao agitador magnético ajustado a 400 rpm, onde a HNT foi adicionada inicialmente, sendo homogeneizada por 1 minuto. Posteriormente, a GG foi incorporada, com mais 1 minuto de agitação. Por fim, a mistura foi submetida ao equipamento SpeedMixer por 5 minutos a 3500 rpm, assegurando a completa homogeneização. Seguindo a mesma metodologia dos hidrogéis de GGLP, os o mesmo foi submetido a análises de reologia, e com base nos resultados obtidos, três concentrações foram determinadas para dar sequência nas análises: LP 5% - GG 0,5%, LP 5% - GG 1,0% e LP 5% - GG 1,5%.

Nos HCs GGLP, a concentração LP foi mantida constante, considerando que a LP pura apresenta capacidade intrínseca de formação de gel. A concentração adotada mostrou-se a mais apropriada para a incorporação da GG. Por outro lado, nos HCs GGHNT, a variável ajustada

foi a porcentagem de GG, uma vez que os HNT não apresentam propriedades gelificantes quando utilizados isoladamente. Assim, a formação do gel nestes sistemas é atribuída exclusivamente à presença da GG.

3.3. Determinação das propriedades reológicas e propriedades físico-químicas

As propriedades de viscosidade e viscoelasticidade dos HCs formulados foram avaliadas utilizando o reômetro rotacional AR 1500ex da TA Instruments em temperatura de 25 °C. Um mL de cada amostra de hidrogel foi analisada com uma geometria cone-placa de aço inoxidável (diâmetro de 40 mm) com o intervalo de medição definido em 52 μm , segundo metodologia adaptada de Dávila e Dávila (2017). Para os testes de varredura de amplitude, as amostras foram expostas à tensão crescente de 0,01 a 400,0%, com frequência angular constante (ω) de 10,0 rad/s. Para os testes de varredura de frequência, as amostras foram expostas a uma frequência decrescente ($\omega = 628$ rad/s a 0,628) e uma deformação oscilatória constante (0,03%), com avaliação de 5 pontos por década.

A análise termogravimétrica (TG) foi utilizada para observar o comportamento e a estabilidade térmica dos hidrogéis, bem como as temperaturas de degradação térmica dos diferentes componentes, determinando assim o perfil de perda de massa. As amostras foram liofilizadas previamente a análise. As análises foram realizadas no equipamento TA instruments, SDT Q-600, com faixa de temperatura de 29 a 800 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio.

Os HCs foram também analisados por FT-IR/ATR com a finalidade de determinar os principais grupos funcionais presentes na matriz do hidrogel. Para isso, foi utilizado o espectrômetro Vertex 70, em modo de transmitância na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com um total de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

3.4. Impressão 3D dos hidrogéis compósitos de GGLP e GGHT

Os HCs sem a inoculação dos microrganismos foram avaliados quanto sua capacidade de printabilidade utilizando a impressora 3D Educacional Starter™ da 3D Biotechnology Solutions. Para tal, 10 mL de cada hidrogel formulado foram transferidos para o cartucho da impressora 3D. Os parâmetros de impressão, nomeadamente diâmetro do bico, pressão e velocidade de impressão foram estipulados através da análise visual, comparando a sua largura com o diâmetro do bico. Foram avaliadas estruturas impressas de 10, 15 e 20 camadas (20 \times 20 mm, altura de camada única de 0,320 mm e 2,0 mm de distância do filamento) previamente

projetadas usando o software 3D Printer Slic3r. O software Pronterface foi utilizado para calibração e comunicação direta com o equipamento. Após a impressão, as plataformas dos HCs impressas em 3D foram submersas em CaCl₂ a 1% (p/v) para que ocorresse o processo de reticulação iônica, conforme descrito por Lameirinhas *et al.* (2023).

3.5. Incorporação de *Trichoderma harzianum* nos HCs

Foram incorporados conídios secos de *T. harzianum*, com viabilidade de $7,83 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colônia (UFCs), à matriz de hidrogel na proporção de 1 g de conídios para 9 g de hidrogel (10% em massa). A incorporação foi realizada por meio de homogeneização em SpeedMixer a 3500 rpm, durante 5 minutos, após a preparação prévia do hidrogel. Além desta, duas metodologias distintas foram também avaliadas: na primeira, glicerina e Tween 20% foram utilizados como aditivos; na segunda, a ordem de preparo foi modificada, com a incorporação inicial dos conídios às argilas, seguida da adição da GG à mistura. O objetivo foi verificar se a variação no modo de preparo dos HCs influenciaria na viabilidade dos conídios. No entanto, os testes de viabilidade realizados não evidenciaram melhorias significativas em nenhuma das abordagens, motivo pelo qual ambas as metodologias citadas foram desconsideradas nas etapas subsequentes do trabalho.

3.6. Ensaio de printabilidade por método manual e testes de viabilidade fúngica

Após a incorporação dos conídios, os HCs obtidos foram individualmente transferidos para seringas, e o processo de impressão manual foi realizado, de modo a simular o funcionamento de uma bioimpressora. A partir desse processo, foram obtidos quatro tipos distintos de amostras, destinadas aos testes de viabilidade fúngica: (1) amostras impressas sem reticulação prévia; (2) amostras impressas seguidas de reticulação com solução de CaCl₂; (3) amostras impressas sem reticulação prévia, submetidas à liofilização; e (4) amostras impressas, reticuladas com CaCl₂ e posteriormente, liofilizadas. Todas as amostras continham conídios do fungo *T. harzianum* e foram submetidas em triplicata ao teste de viabilidade fúngica, composto por três etapas:

- a) Determinação da concentração de conídios em câmara de Neubauer: 1g de amostra foi pesada e diluída em 9 mL de água destilada contendo 0,1% de Tween 80. O material foi agitado em vórtex, e em seguida, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo contendo 9mL da mesma solução de água com Tween. O processo se repetiu novamente, obtendo-se uma diluição seriada até a concentração 10^{-4} , conforme ilustrado na Figura 14.

Por fim, 1 mL da última diluição foi retirado para preenchimento da câmara de Neubauer, com a finalidade de contar os conídios nos quatro quadrantes externos da câmara. Ao final da contagem, foi aplicada a fórmula: N° de propágulos/mL = n° de propágulos $\times 10^4 \times 10^n$ da diluição, obtendo-se assim, ao final, a concentração de conídios na amostra.

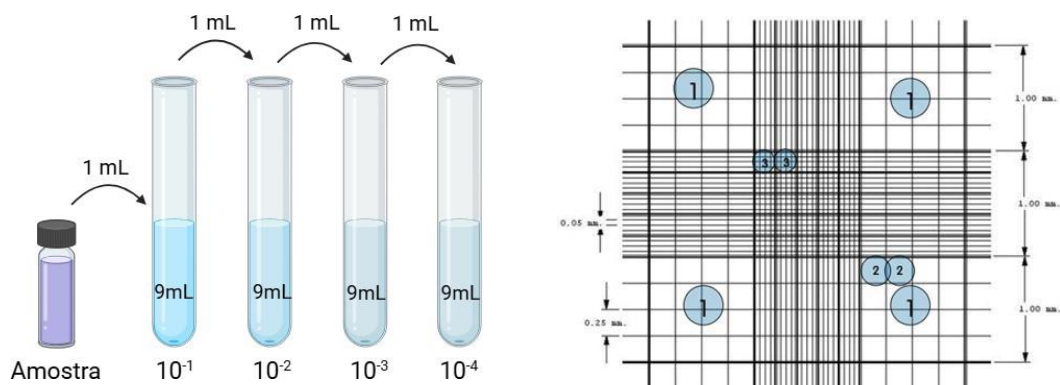


Figura 14. Esquema do processo de diluição seriada (à esquerda) e imagem ilustrativa da câmara de Neubauer (à direita). Para a realização da contagem dos conídios, foram considerados os 16 quadrados representados pelo número 2, totalizando 64 quadrados da câmara completa.

- b) Viabilidade dos conídios: 100 μ L da suspensão fúngica utilizada para determinar a concentração foi distribuída sob a superfície de uma placa de Petri contendo meio BDA contendo 0,5% de antibiótico, com o auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada. A placa foi tampada e levada para estufa BOD a 26 $^{\circ}$ C por um período de 18 horas, período necessário para que ocorresse a germinação dos conídios. Após esse período, a placa foi levada ao microscópio óptico comum, no aumento de 400x, e foi realizada contagem de aproximadamente 100 estruturas, sendo separadas quanto à presença ou ausência de tubo germinativo, calculando-se a média e a porcentagem de germinados. Para as amostras que foram positivas para a presença de tubos germinativos após as 18h, a análise se encerrou nessa etapa com a liberação do laudo contendo a porcentagem de conídios germinados. Para as amostras que tiveram ausência de germinação, as placas foram mantidas na BOD por 5 dias, a fim de se avaliar a formação de UFC/mL.
- c) Contagem de UFCs: Após o período de 5 dias, as placas incubadas foram avaliadas macroscopicamente quanto à presença ou ausência de UFCs. Foi realizada uma contagem da quantidade total de UFCs na placa, e o número total foi inserido na fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de UFCs na placa} \times 10^{n^{\circ} \text{ de diluições}}$$

A fim de se obter a quantidade de UFCs viáveis/mL.

3.7. Impressão dos *scaffolds* de GGLP e GGHNT contendo *T. harzianum*

Estruturas tridimensionais contendo diferentes números de camadas foram bioimpressas com o propósito de investigar de forma sistemática a influência da espessura das plataformas impressas sobre o perfil de liberação dos microrganismos encapsulados na matriz do hidrogel, buscando compreender se as variações estruturais poderiam interferir na difusão e na dinâmica de liberação dos agentes biológicos.

Para isso, 10 mL dos hidrogéis LP 5% - GG 2,0% e GG 3% - HNT 1,0%, ambos contendo 10% de conídios fúngicos (m/m) foram transferidos para o cartucho da impressora 3D. Foram mantidos os mesmos parâmetros de impressão utilizados na impressão dos hidrogéis sem a adição dos fungos. Foram impressas estruturas circulares de 2 cm com 100% de preenchimento, que apresentavam 1, 4 e 8 camadas, previamente projetadas usando o software 3D Printer Slic3r. O software Pronterface foi utilizado para calibração e comunicação direta com o equipamento. Após a impressão, as plataformas dos HCs impressas em 3D foram submersas em CaCl_2 a 1% (p/v) para que ocorresse o processo de reticulação iônica, conforme descrito por Lameirinhas *et al.* (2023).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Biocompósitos baseados em GGLP e GGHNT

Para o preparo dos hidrogéis foram adotadas duas abordagens distintas: uma utilizando LP e a outra combinando HNT com três diferentes concentrações de GG e das argilas mencionadas. O objetivo foi investigar o impacto das diferentes concentrações das argilas e GG nas propriedades físico-químicas e estruturais dos materiais resultantes. O método de preparo incluiu etapas de aquecimento e homogeneização com o uso do equipamento SpeedMixer, um sistema de centrifugação dupla assimétrica que gera forças centrífugas alternadas, promovendo desaglomeração eficiente e minimizando a incorporação de bolhas de ar. Essa abordagem garante maior homogeneidade e reprodutibilidade no preparo de diferentes sistemas farmacêuticos, incluindo hidrogéis (KOEHLER *et al.*, 2023; MASSING, CICKO & ZIROLI, 2008). Foram testadas diferentes concentrações de GG para cada tipo de argila, e as formulações resultantes foram submetidas a análises de reometria com o objetivo de selecionar aquelas com melhor desempenho para bioimpressão 3D. Os HCs desenvolvidos podem ser observados na Figura 15.

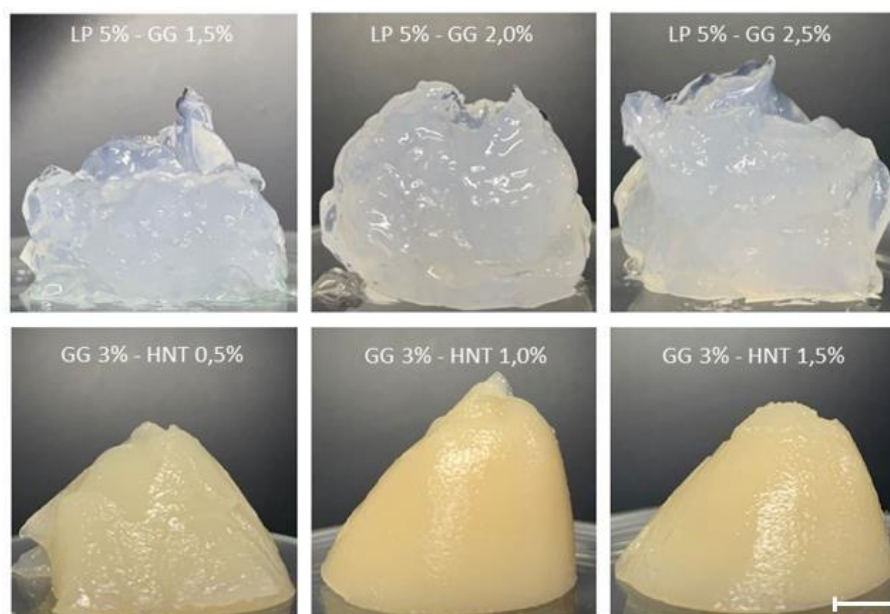


Figura 15. HCs contendo LP (acima) e HCs contendo HNT (abaixo), e suas respectivas concentrações. A barra de escala equivale a 1 cm.

Diferenças significativas puderam ser observadas entre os HCs contendo LP e aqueles contendo HNT. Os HCs formulados com LP apresentaram uma coloração transparente levemente esbranquiçada, enquanto os contendo HNT exibiram uma coloração amarelo-bege, correspondente à cor *in natura* da argila, e totalmente opaca, cuja intensidade aumentou proporcionalmente à concentração de argila na amostra. Além disso, diferenças texturais também foram evidenciadas entre as formulações. Os HCs contendo LP apresentaram uma textura homogênea, semelhante a géis capilares, enquanto aqueles contendo HNT demonstraram uma consistência similar à de uma gelatina, com ausência de homogeneidade quando misturados à temperatura ambiente, tornando-se uniformes apenas sob aquecimento.

4.2. Reologia

Análises de reologia oscilatória foram realizadas a fim de se avaliar as alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos géis. Nas análises de tensão controlada, um torque oscilante foi aplicado na placa superior e o deslocamento angular resultante foi medido (θ), a partir do qual a deformação (γ) foi calculada a partir da multiplicação do deslocamento angular pela constante de deformação ($K\gamma$), conforme descrito na Equação 1.

$$\gamma = \theta.K\gamma \quad (\text{Equação 1})$$

A razão entre a tensão aplicada e a deformação medida fornece o módulo complexo (G^*), que é uma medida quantitativa da rigidez do material ou resistência à deformação e pode ser dividido em dois componentes, segundo a Equação 2 (BRETAS & D'ÁVILA, 2005).

$$G^* = G' + iG'' \quad (\text{Equação 2})$$

Um dos componentes é o módulo de armazenamento (G'), que mede a energia de deformação armazenada pela amostra. Essa energia atua como uma força que resiste à deformação sofrida pela estrutura durante o cisalhamento, refletindo o comportamento elástico do material. O outro componente é o módulo de perda (G''), que mede a energia de deformação dissipada pela amostra durante o cisalhamento. Essa energia é consumida no processo de alteração estrutural do material, indicando o início do fluxo e representando o comportamento viscoso (MEZGER, 2014).

4.2.1. Varreduras de Amplitude

Durante o primeiro teste, uma deformação oscilatória crescente foi aplicada em todas as amostras para investigar o comportamento da estrutura da matriz, desde sua forma intacta até a quebra de sua rede polimérica. A *linear viscoelastic region* (LVE), ou região linear viscoelástica, determinada pelas linhas tracejadas nas Figuras 16a e 16b, corresponde ao intervalo de deformação em que a estrutura do material permanece estável e intacta, sendo identificada pela constância dos valores de G' e G'' . O limite da LVE, também conhecida como deformação crítica (γ_c), é o valor de amplitude no qual os valores do módulo de armazenamento deixam de ser lineares, sendo o γ_c tipicamente determinado como o primeiro ponto no qual G' atinge um valor igual ou inferior a 90–95% do seu valor inicial (HERRADA-MANCHÓN, FERNÁNDEZ & AGUILAR, 2023).

Conforme visualizado na Figura 16a, para os HCs GGLP, observou-se que a amostra de GG pura apresentou o menor valor de LVE, registrado em 1,5% de deformação oscilatória. Em contrapartida, a amostra de LP pura exibiu o maior valor, em torno de 4%. As amostras dos HCs, em todas as concentrações avaliadas, demonstraram valores intermediários em relação às amostras puras, em torno de 2,5%. Após valores de deformação que ultrapassam a LVE, os módulos do material começaram a variar, caracterizando um regime não linear. Os módulos G' e G'' aproximaram-se até se cruzarem, como pode ser observado na Figura 16b, o que indica a ruptura da estrutura do gel. A partir desse ponto, os módulos de perda passaram a predominar, indicando que o material assumiu um comportamento predominantemente líquido (ZUIDEMA *et al.*, 2014).

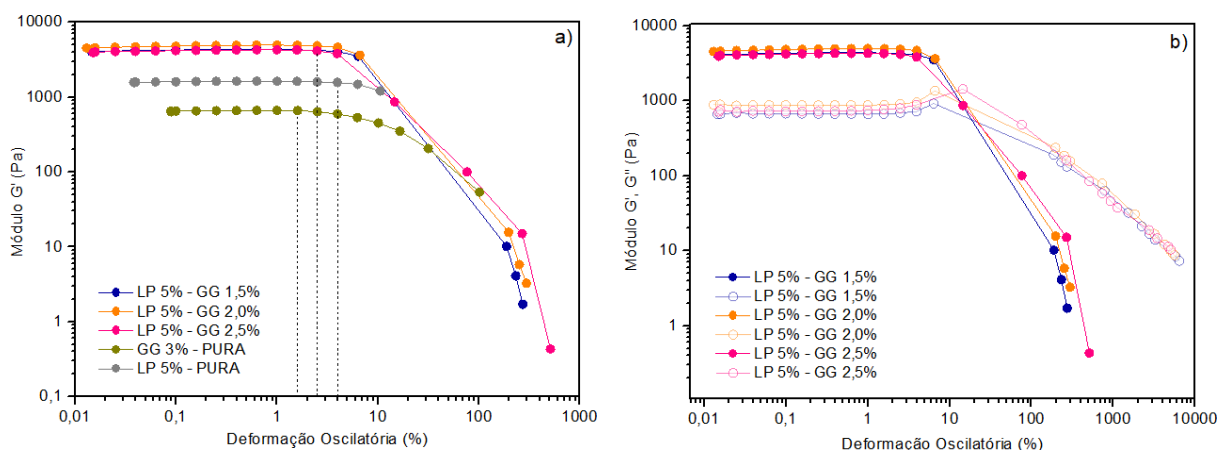


Figura 16. a) Reograma de teste de varredura de amplitude a 25 °C das amostras dos HCs GGPLP. a) valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 2,5% (rosa), demonstrando as LVEs (linhas tracejadas). b) valores de G' e G'' das três concentrações de HCs, mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados).

Em relação aos resultados dos testes de varredura de amplitude dos HCs GGHNT, os mesmos estão demonstrados na Figura 17.

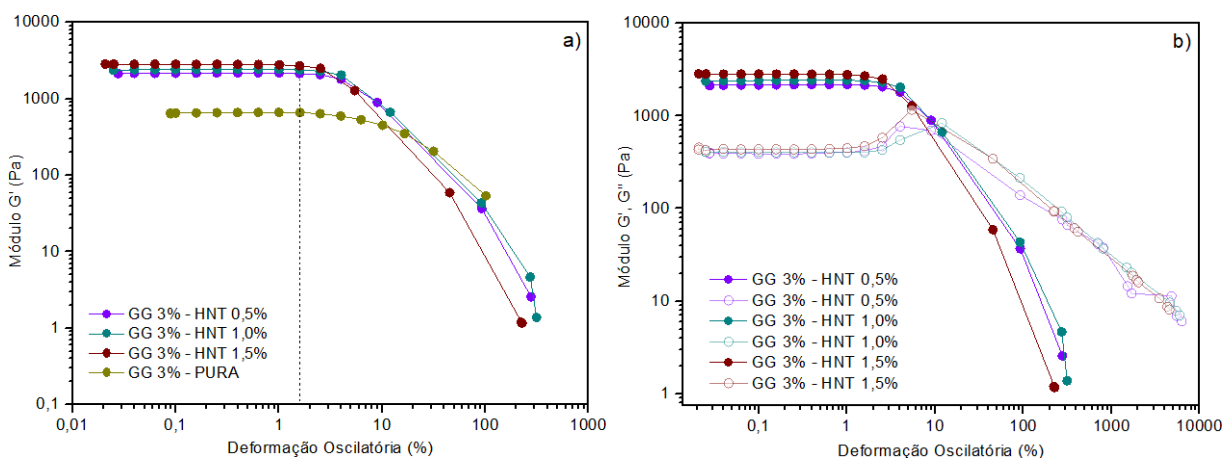


Figura 17. a) Reograma de teste de varredura de amplitude a 25 °C das amostras dos HCs GGHNT. a) valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde) e GG 3% - HNT 1,5% (vinho), demonstrando as LVEs (linhas tracejadas). b) valores de G' e G'' das três concentrações de HCs, mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados).

Conforme observado na Figura 17a, o valor da região linear viscoelástica (LVE) foi o mesmo para todas as amostras avaliadas, o que pode estar relacionado à baixa concentração de HNT incorporada às formulações. Os resultados apresentados na Figura 17b evidenciam o momento em que os valores de deformação ultrapassam a região LVE, provocando variações nos módulos do material e iniciando um regime não linear, característico do colapso transitório

da rede estrutural. Observa-se que G' e G'' se aproximam até a interseção de suas curvas, indicando a ruptura da estrutura do gel e a predominância de características de fluido.

Ao comparar os HCs, observa-se que as amostras de GGLP apresentaram o relaxamento da rede polimérica — evidenciado pelo cruzamento entre G' e G'' — em uma deformação de oscilação em torno de 11%, enquanto nas amostras de GGHNT esse cruzamento ocorreu por volta de 9%. Esses resultados indicam que os HCs GGLP possuem uma rede estrutural mais resistente à deformação, sugerindo maior integridade mecânica sob condições de estresse.

4.2.2. Varreduras de Frequência

Um gel pode ser definido pela predominância do comportamento sólido, ou seja, pela predominância do comportamento elástico em relação ao viscoso, com $G' > G''$ em uma faixa de frequência específica (AMORIM *et al.*, 2021). Quando $G' > G''$, a amostra exibe uma estrutura sólida ou gelatinosa, indicando um material sólido viscoelástico. Por outro lado, quando $G'' > G'$, a amostra demonstra uma estrutura semelhante a um fluido, indicando um líquido viscoelástico (HERRADA-MANCHÓN, FERNÁNDEZ & AGUILAR, 2023).

Os resultados obtidos referentes aos HCs GGLP, apresentados na Figura 18, evidenciaram curvas localizadas em diferentes níveis, com G' consistentemente superior a G'' em todas as amostras analisadas. Tal comportamento reforça a predominância da natureza sólida sobre a líquida, caracterizando uma estrutura de gel consolidada. Especificamente, na frequência de 0,628 rad/s, observou-se que a amostra contendo apenas GG apresentou o menor valor de G' , aproximadamente 657 Pa. Em contraste, a amostra contendo apenas LP apresentou um valor superior, em torno de 1615 Pa. Os HCs, por sua vez, apresentaram valores ainda mais elevados: a formulação LP 5% – GG 1,5% alcançou 2690 Pa; LP 5% – GG 2,5%, 3670 Pa; e LP 5% – GG 2,0%, o maior valor, com 4670 Pa.

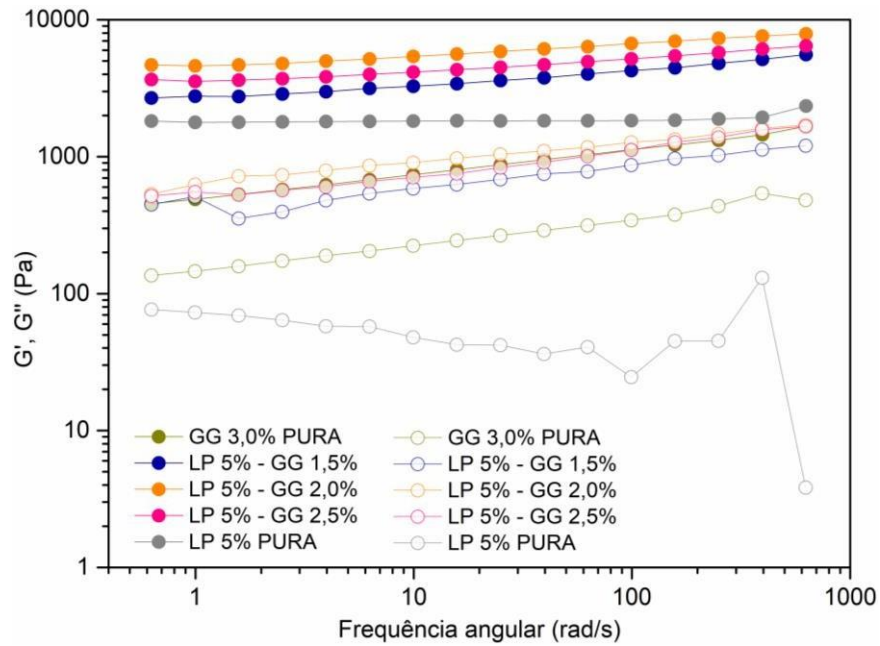


Figura 18. Curvas de varredura de frequência a 25 °C das amostras dos HCs GGLP. a) GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 2,5% (rosa), mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados).

As análises demonstraram também que o módulo de armazenamento (G') aumentou com o aumento da frequência angular, mantendo-se superior ao módulo de perda (G'') ao longo de toda a faixa analisada, sem ocorrência de cruzamento entre as curvas. Esse comportamento evidencia a predominância da resposta sólida sobre a líquida, indicando que os materiais apresentam um comportamento viscoelástico sólido consistente. Como esse padrão foi observado em todas as amostras, pode-se inferir que os HCs possuem rigidez estrutural praticamente constante em toda a faixa de frequência, o que é característico de materiais com rede tridimensional bem estabelecida (YI & ZHANG, 2007).

Adicionalmente, a presença de partículas de LP dispersas na matriz do hidrogel parece contribuir para a formação e estabilização dessa rede tridimensional, reforçando a característica sólida do material (ALMEIDA *et al.*, 2024). Esses resultados indicam que a combinação de GG com LP resultou em uma melhoria significativa das propriedades reológicas dos HCs, em comparação às amostras contendo apenas o biopolímero isoladamente. Sugere-se que a GG, um polímero aniônico linear com carga negativa, esteja sendo adsorvida nas bordas das plaquetas de LP, as quais possuem carga positiva. Essa interação eletrostática pode contribuir para o fortalecimento da matriz do hidrogel, promovendo uma estrutura mais coesa e resistente ao estresse mecânico. Resultados semelhantes foram reportados por Dávila & Dávila (2017), os quais observaram alterações significativas no comportamento reológico de soluções de alginato

com a adição de LP. Segundo os autores, o efeito da LP como agente modificador reológico é diretamente influenciado pela concentração do polímero base.

Os resultados obtidos para os HCs GGHNT, apresentados na Figura 19, revelaram perfis de resposta viscoelástica com curvas situadas em diferentes níveis, mantendo-se o módulo de armazenamento (G') consistentemente superior ao módulo de perda (G'') em todas as amostras analisadas. Esse comportamento reforça a predominância das características sólidas e confirma a formação efetiva de uma rede tridimensional típica de hidrogéis. Observa-se que a amostra contendo apenas GG apresentou o menor valor de G' , aproximadamente 657 Pa. Em contraste, as amostras contendo HNT em diferentes concentrações demonstraram valores significativamente mais elevados.

A amostra GG 3% – HNT 0,5% apresentou G' de aproximadamente 2117 Pa; a formulação GG 3% – HNT 1,0%, cerca de 2340 Pa; e a amostra com maior teor de HNT (GG 3% – HNT 1,5%) atingiu o valor de 2850 Pa. Esses dados foram obtidos na frequência de 0,628 rad/s. Dessa forma, conclui-se que o aumento da concentração de HNT contribui para o reforço estrutural da matriz do hidrogel, refletido no aumento progressivo do módulo G' . Tal comportamento sugere que os nanotubos atuam como agentes de reforço, promovendo interações físicas com a GG e favorecendo a formação de uma rede mais coesa e rígida.

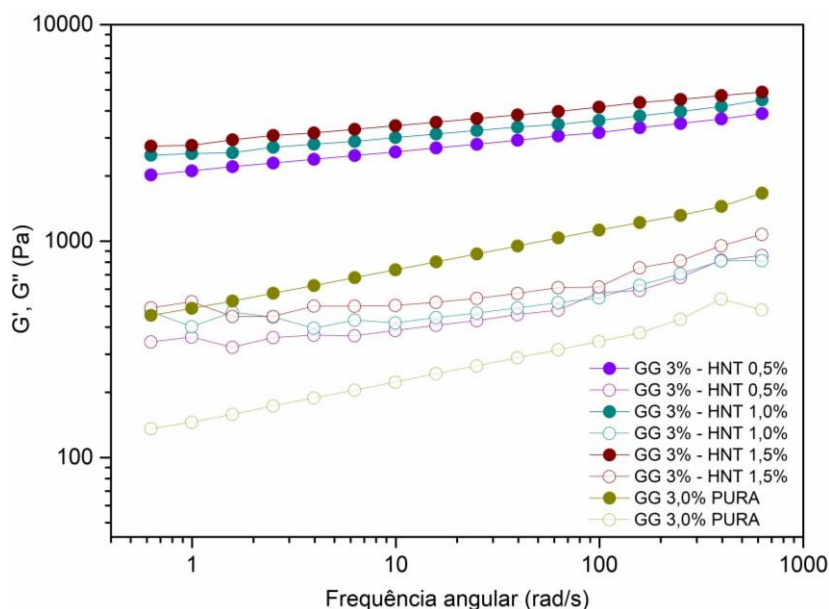


Figura 19. Curvas de varredura de frequência a 25 °C das amostras dos HCs GGHNT. a) valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde) e GG 3% - HNT 1,5% (vinho), mostrando G' (círculos preenchidos) e G'' (círculos delineados).

Assim como nos HCs GGLP, as análises de frequência dos HCs GGHNT também mostraram que o módulo G' aumenta com o aumento da frequência e permanece superior ao

módulo G'' ao longo de toda a faixa, sem que ocorra cruzamento entre as curvas, indicando que a resposta sólida do material é predominante, com rigidez estrutural praticamente constante em toda a faixa de frequência analisada, o que aumenta a probabilidade de que o material venha a manter a sua estrutura após a deposição no processo de impressão 3D (BOM *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos demonstram que a incorporação de HNT à GG promove uma melhoria significativa nas propriedades reológicas dos HCs em comparação à GG pura. Esse aprimoramento pode ser atribuído à presença de grupos hidroxila (-OH) na estrutura da GG, que possibilitam a formação de ligações de hidrogênio com a superfície dos HNTs, especialmente com os grupos Si-O, resultando no reforço da rede tridimensional do hidrogel. Além disso, interações eletrostáticas também contribuem para a estabilização da estrutura, conforme descrito por Sakloetsakun & Pongjanyakul (2017).

Resultados semelhantes foram reportados por Zhao *et al.* (2022), que investigaram as propriedades viscoelásticas de hidrogéis de quitina modificados pela adição de HNTs carregados com ouro. Os autores observaram um aumento nos valores do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') em comparação aos hidrogéis formulados apenas com quitina, e atribuíram essa melhora ao efeito de reforço promovido pelas nanopartículas tubulares rígidas de HNTs, que atuam sobre a matriz polimérica, conferindo maior resistência mecânica ao sistema.

4.2.3. Ensaio de Viscosidade Complexa

A resistência ao fluxo em função da frequência angular, definida como viscosidade complexa, foi determinada para os HCs GGLP e estão demonstradas na Figura 20.

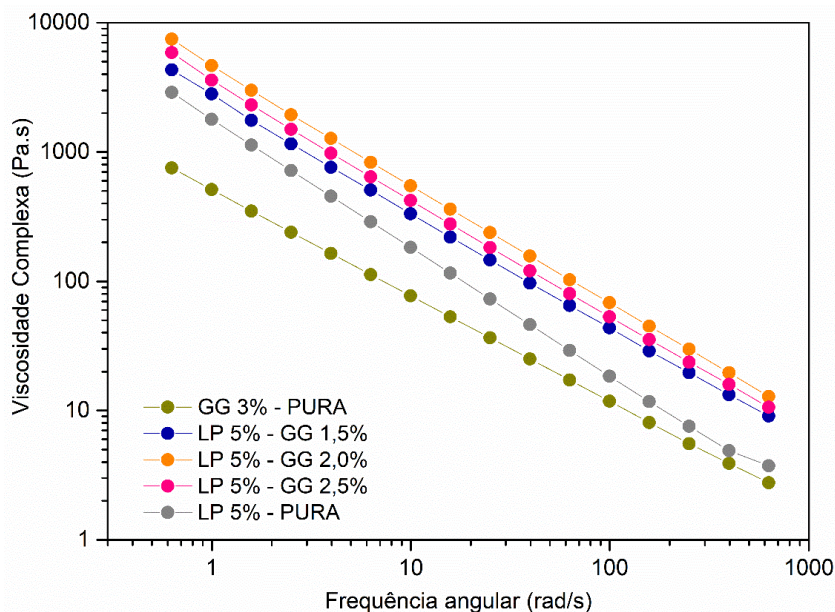


Figura 20. Curvas de viscosidade complexa a 25 °C das amostras dos HCs GGLP, mostrando valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 2,5% (rosa).

Os resultados obtidos indicam que, com o aumento da frequência angular, há uma diminuição na viscosidade complexa, corroborando a evidência de que os hidrogéis apresentam comportamento de fluido pseudoplástico (ZHONG *et al.*, 2024). Esse comportamento torna os hidrogéis ideais para aplicações em impressão 3D, uma vez que, durante a extrusão da tinta, é necessária uma redução na viscosidade para que o material flua adequadamente pelo bico da impressora.

Em relação à GG, de maneira geral, quando em repouso, as cadeias dos polímeros encontram-se emaranhadas de forma aleatória. Contudo, sob a ação do cisalhamento oscilatório (associado ao aumento da frequência angular), essas cadeias podem ser gradualmente desembaraçadas ou alinhadas na direção do fluxo, resultando na redução da viscosidade (DE OLIVEIRA CARDOSO, GREMIÃO & CURY, 2020). Em relação às amostras de LP, sob baixas frequências ou situações de cisalhamento baixo, forma-se uma estrutura organizada similar a um castelo de cartas. À medida que a frequência angular aumenta, ou que a taxa de deformação se eleva, ocorre o colapso dessa estrutura. Nesse processo, as plaquetas se orientam na direção do fluxo, resultando na diminuição da viscosidade, característica de materiais com comportamento pseudoplástico (DÁVILA & DÁVILA, 2017).

Os resultados obtidos indicam que a viscosidade complexa dos HCs contendo LP é superior à das amostras puras, o que sugere que a adição de LP melhora as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis de GG. Esse aumento na viscosidade pode ser atribuído à formação

de interações entre as plaquetas de LP e as cadeias de GG, criando uma rede híbrida mais robusta. Pacelli *et al.* (2017) também observaram que a incorporação de 1% p/v de LP em redes de metacrilato de GG levou ao aumento da viscosidade das soluções, evidenciando a importância das interações argila/polímero para o reforço estrutural e propriedades reológicas do sistema.

Já em relação às curvas de viscosidade complexa dos HCs GGHNT, apresentadas na Figura 21, é possível observar que, da mesma forma que os HCs GGLP, os hidrogéis apresentaram um comportamento de fluido pseudoplástico.

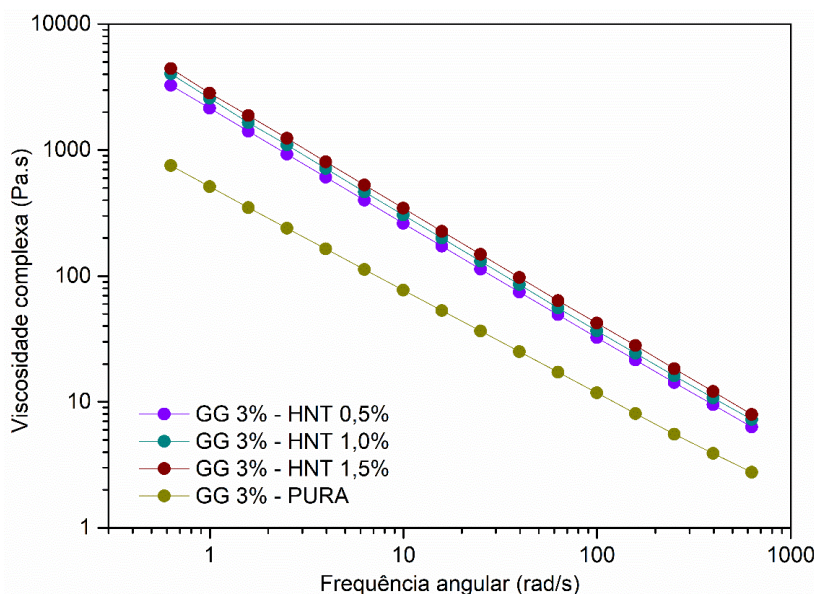


Figura 21. Curvas de viscosidade a 25 °C das amostras dos HCs GGHNT, mostrando valores de G' das amostras GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde) e GG 3% - HNT 1,5% (vinho).

Os resultados obtidos indicam que, assim como nas amostras de GGLP, a viscosidade complexa diminui com o aumento da frequência angular, reforçando a evidência de que os HCs exibem comportamento pseudoplástico (ZHONG *et al.*, 2024). Pode-se notar também que os valores de viscosidade complexa dos HCs são superiores aos da amostra de GG pura, sugerindo que a incorporação de HNT aprimora as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis de GG. Esse aumento na viscosidade pode ser atribuído à formação de uma rede estrutural mais robusta devido à interação entre as plaquetas de HNT e as cadeias de GG.

4.3. Análise Termogravimétrica

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica e as perdas de massa dos compósitos obtidos em relação ao aumento da temperatura, foram obtidas curvas TG sob atmosfera de N_2 . A figura 22 mostra as curvas TG referente aos HCs GGLP.

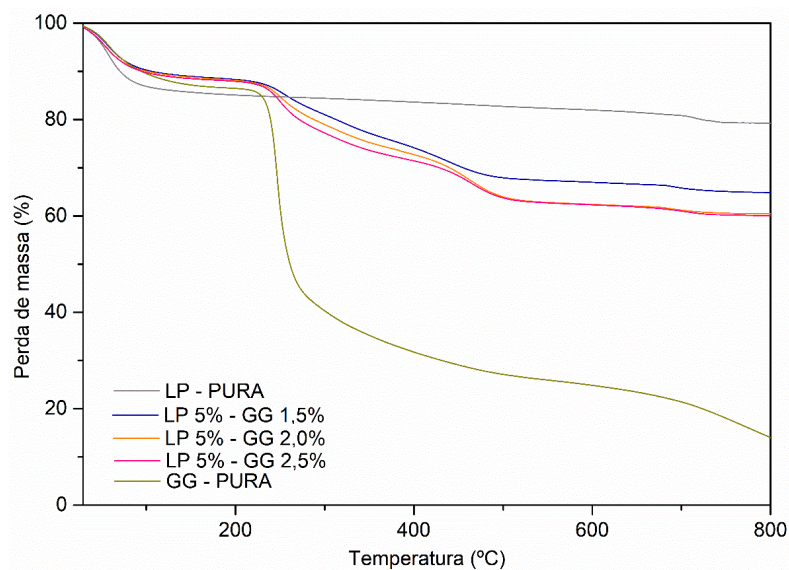


Figura 22. Curva TG dos HC's GGLP. As curvas apresentam o resultado das amostras LP - PURA (cinza), LP 5% - GG 1,5% (azul), LP 5% - GG 2,0% (laranja), LP 5% - GG 2,5% (cor-de-rosa) e GG 3% - PURA (amarelo escuro).

Observa-se que as amostras contendo LP apresentam um perfil de estabilidade térmica e de perda de massa distinto em comparação a amostra de GG pura. A amostra de GG pura apresenta 3 etapas de perda de massa, sendo a primeira de aproximadamente 18%, entre 30 °C e 140 °C, atribuída a perda de água presente no material. A segunda e principal etapa de perda de massa ocorre entre 165 °C e 545 °C, resultando em uma redução de cerca de 55% em massa, possivelmente relacionada à ruptura da cadeia polimérica, fragmentação em monômeros e degradação de grupos funcionais voláteis (ALVES *et al.*, 2022). Por fim, uma terceira etapa de perda de massa de 545 a 800 °C, referente à decomposição de resíduos carbonáceos ao redor de 10%, restando ainda 17% de resíduo. Este comportamento é semelhante ao obtido por WU *et al.*, 2022.

Em relação a amostra de LP pura, curva TG indica duas etapas distintas de perda de massa. A primeira entre 30 °C e 120 °C, com perda de 15% em massa, pode ser atribuída à desidratação. A estabilidade térmica foi mantida até 715 °C, quando se observou um segundo evento de perda de massa de cerca de 2%, relacionado ao processo de desidroxilação das lamelas da argila e à formação de óxidos (DANIEL, FROST & ZHU, 2008; GUIMARÃES, CIMINELLI & VASCONCELOS, 2007).

As curvas TG para os compósitos GGLP apresentaram quatro eventos distintos de perda de massa. O primeiro, entre 30 e 140 °C, é atribuída a perda de água intermolecular. As duas etapas seguintes, de 165 a 345 °C, e de 345 a 582 °C relacionadas à ruptura da cadeia polimérica, fragmentação em monômeros e degradação de grupos funcionais voláteis.

Entretanto, as curvas evidenciaram a interação entre a GG e a LP, uma vez que a adição das argilas modificou o perfil de perda de massa do compósito, constatando a formação do mesmo. Por fim, o último evento de perda de massa ocorreu por volta de 690 °C, e está relacionado com a desidroxilação das lamelas da argila, como demonstrado por Daniel, Frost & Zhu, (2008). Os valores de perda de massa em diferentes temperaturas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Etapas de perda de massa dos materiais GG pura, LP pura e compósitos GGLP mostrando o intervalo de temperatura e a porcentagem de perda de massa.

Amostra	30 – 140 °C (%)	165 – 545 °C (%)	165 – 345 °C (%)	345 – 582 °C (%)	600 – 800 °C (%)
GG – PURA	18	55	-	-	10
LP 5% - GG 1,5%	12	-	11	10	1
LP 5% - GG 2,0%	12	-	13	12	1
LP 5% - GG 2,5%	12	-	15	10	1
LP – PURA	15	-	-	-	2

As amostras correspondentes aos HCs GGHNT também foram submetidas à análise do perfil de perda de massa. A Figura 23 apresenta as curvas TG para as amostras de GGHNT.

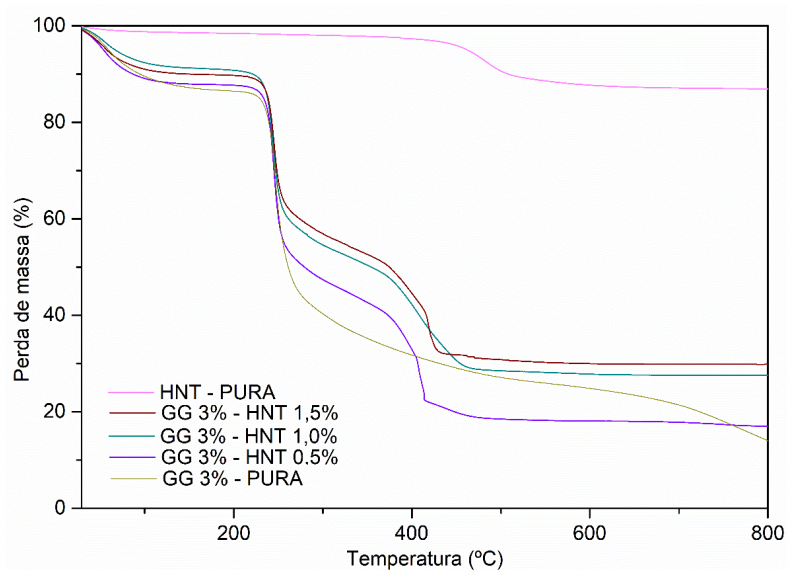


Figura 23. Curvas TG dos HCs GGHNT. As curvas apresentam os resultados de HNT - PURA (rosa claro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (azul), GG 3% - HNT 1,5% (vermelho) e GG 3% - PURA (amarelo escuro).

A curva TG para a amostra HNT pura apresentou duas etapas de perda de massa. A primeira entre 30 e 140 °C, com perda de 1,5% em massa, pode ser atribuída à desorção de água interlamelar e adsorvida na superfície da argila. Já a segunda etapa de perda de massa entre 365

e 650 °C, com perda de 11% em massa é atribuída à desidroxilação da HNT (CHEING *et al.*, 2010).

As curvas TG para os compósitos GGHNT apresentaram 3 etapas de perda de massa, sendo a primeira entre 30 e 150 °C, com perda de 9% em massa para a amostra GG 3% - HNT 1,0%, 10% para a amostra GG 3% - HNT 1,5% e 13% para a amostra GG 3% - HNT 0,5%, está relacionada a perda de água presente nas amostras. A segunda etapa de perda de massa entre 187 e 327 °C, sendo 33% para GG 3% - HNT 1,5%, 38% para GG 3% - HNT 1,0% e 43% para GG 3% - HNT 0,5% pode ser atribuída a ruptura da cadeia polimérica, fragmentação em monômeros e degradação de grupos funcionais voláteis da porção de GG presente nas amostras. A terceira perda de massa entre 328 e 550 °C, sendo que GG 3% - HNT 1,0% e GG 3% - HNT 1,5% apresentaram perda de 25% em massa e GG 3% - HNT 0,5% apresenta perda de 28% em massa evidencia a interação entre a GG e a HNT, uma vez que a incorporação das argilas modificou o perfil de degradação térmica nesta etapa de decomposição térmica, sugerindo a formação de um material compósito. Os valores de perda de massa em diferentes temperaturas encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Etapas de perda de massa dos materiais GG pura, HNT pura e compósitos GGHNT mostrando o intervalo de temperatura e a porcentagem de perda de massa.

Amostra	30 – 150 °C (%)	165 – 545 °C (%)	187 – 327 °C (%)	328 – 550 °C (%)	365 – 650 °C (%)
GG – PURA	18	55	-	-	-
GG 3% - HNT 0,5%	13	-	43	28	-
GG 3% - HNT 1,0%	9	-	38	25	-
GG 3% - HNT 1,5%	10	-	33	25	-
HNT – PURA	1,5	-	-	-	11

É possível observar que os hidrogéis GGHNT apresentaram um perfil de degradação térmica distinto em relação à amostra de GG pura, caracterizando a formação de compósitos. Além disso, o aumento da massa residual nas amostras de HCs indicou a incorporação de argilas na matriz polimérica.

Marin *et al.* (2021) desenvolveram biomateriais compósitos à base de colágeno e da argila cloisite, observando por meio de curvas TG que a presença da argila contribuiu para o aumento da estabilidade térmica de todas as amostras. De maneira semelhante, Suner *et al.* (2019) avaliaram a estabilidade térmica de criogéis compósitos baseados em ácido hialurônico (HA) e HNT, demonstrando que o aumento na concentração de HNT reduziu significativamente a perda de massa, indicando uma melhoria na estabilidade térmica dos criogéis. Portanto, é

possível concluir que, para as amostras de compósitos GGLP e GGHT, observou-se uma correlação positiva entre o aumento da concentração de argila e a melhoria no desempenho térmico, resultados que se mostram consistentes com a literatura.

4.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Com o objetivo de identificar grupos funcionais e fornecer informações sobre a estrutura molecular das amostras analisadas, foram obtidos espectros de infravermelho com comprimento de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} .

A Figura 24 mostra os espectrogramas de FT-IR das amostras de GG e LP puras, e dos compósitos GGLP.

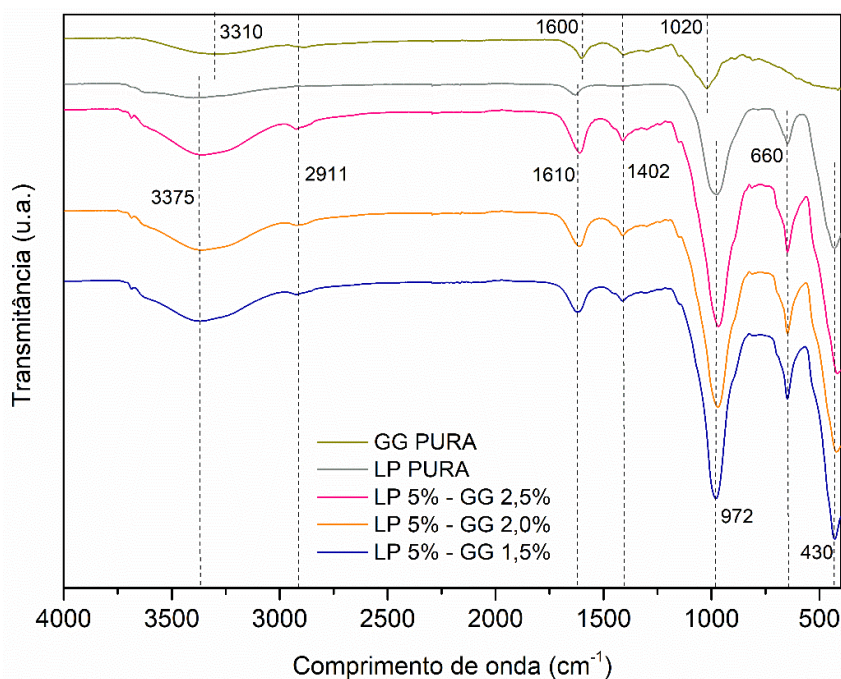


Figura 24. Espectros de FT-IR de GG pura (amarelo escuro), LP pura (cinza), LP 5% - GG 2,5% (rosa), LP 5% - GG 2,0% (laranja) e LP 5% - GG 1,5% (azul).

Como pode ser observado na Figura 24, foi identificada na amostra de GG pura uma banda de absorção em 3310 cm^{-1} , atribuída ao estiramento do grupo hidroxila (-OH) (ALHARBI *et al.*, 2024). Além disso, a banda em 2911 cm^{-1} pode ser vista também nos HCs, e está associada às vibrações de estiramento C-H. As bandas localizadas em 1600 cm^{-1} e 1402 cm^{-1} correspondem, respectivamente, ao estiramento assimétrico e simétrico do ânion carboxilato do ácido carboxílico, sendo a segunda banda também visualizada nas três amostras de HCs (LEE *et al.*, 2012). Por fim, a banda observada em 1020 cm^{-1} está relacionada à vibração de estiramento do grupo C-O (WANG, WEN & BAI, 2016).

Em relação a amostra de LP pura, é possível identificar uma banda em 3375 cm^{-1} que está associada às vibrações de estiramento intramolecular do grupo OH, especificamente da molécula de água (H_2O) adsorvida na superfície do material. Essa banda também foi observada nas três concentrações de HCs produzidas. Já a banda em 1610 cm^{-1} corresponde às vibrações de flexão do grupo OH, também relacionadas à presença de água adsorvida, e pode ser observada tanto na amostra de LP, quanto na amostra dos HCs. Outra banda pode observada em 972 cm^{-1} e é referente às ligações silício-oxigênio (Si–O), que são características da estrutura da LP, que é um silicato de magnésio. Por fim, duas bandas podem ser observadas em 660 cm^{-1} e 430 cm^{-1} que são equivalentes a deformação angular dos grupos Mg–O e Si–O (SILVA *et al.*, 2019). Todas as bandas puderam ser observadas nas três amostras de HCs, o que indica a presença de LP na formação dos materiais compósitos. A Tabela 5 traz os principais grupos funcionais identificados nos espectros de transmitância das amostras de GG e LP puras, e dos compósitos GGLP.

Tabela 5. Representação das principais bandas atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de GG e LP puras, e dos compósitos GGLP.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Constituinte	Grupo Funcional
3310	GG	Estiramento do -OH
2911	GG / GGLP	Estiramento de -CH
1600	GG	Estiramento assimétrico –COO
1402	GG / GGLP	Estiramento simétrico –COO
1020	GG	Estiramento de C-O
3375	LP / GGLP	Estiramento de OH
1610	LP / GGLP	Flexão de OH
972	LP / GGLP	Si–O
660	LP / GGLP	Deformação angular de Mg–O
430	LP / GGLP	Deformação angular de Si–O

Em relação aos HCs GGHNT, a Figura 25 apresenta os espectros de FT-IR das amostras de GG e HNT puras, bem como dos compósitos formulados a partir desses materiais.

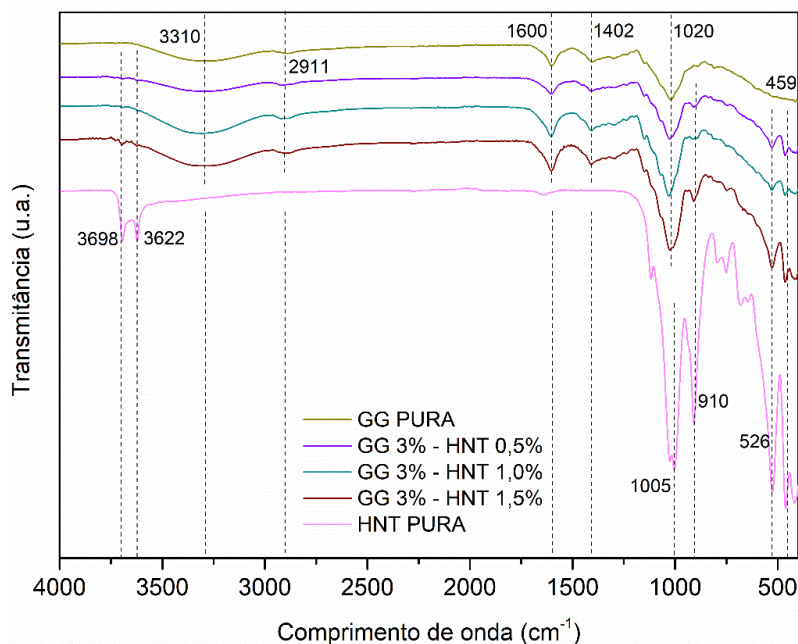


Figura 25. Espectros de FT-IR de GG pura (amarelo escuro), GG 3% - HNT 0,5% (roxo), GG 3% - HNT 1,0% (verde), GG 3% - HNT ,5% (vermelho) e HNT pura (rosa).

Com base nos resultados apresentados, é possível observar que os todas as amostras dos HCs apresentaram as bandas características da GG pura, que foram anteriormente discutidas no item 4.5.1. Os espectros de FTIR para a amostra de HNT pura revelaram bandas de absorção específicas em 3698 cm^{-1} e 3622 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, à vibração de flexão do grupo Al–O–OH (DURGUT *et al.*, 2024) e ao estiramento do Al–OH interno. Essa última vibração ocorre devido à conexão dos grupos hidroxila da superfície interna às folhas octaédricas de Al, que formam ligações de hidrogênio com a folha de oxigênio da camada adjacente. Como é característico da HNT, outros dois grupos hidroxila internos, que geralmente absorvem em aproximadamente 3650 cm^{-1} e 3670 cm^{-1} , não foram detectados neste espectro (GAAZ *et al.*, 2017).

A vibração de estiramento observada em 1005 cm^{-1} foi atribuída à presença de ligações Si–O–Si (BAROT, RAWTANI & KULKARNI, 2020). A banda de absorção observada em 910 cm^{-1} é correspondente à vibração de flexão Al–O–OH (RAWTANI *et al.*, 2017), enquanto a banda em 526 cm^{-1} é associada ao estiramento de ligações Si–O com vibrações Al–O–Si (DARAIE *et al.*, 2021). Por fim, uma última vibração de flexão de Si–O foi identificada em 459 cm^{-1} (DURGUT *et al.*, 2024). É possível concluir, portanto, que a similaridade entre o espectro de FTIR da HNT e dos HCs GGHNT indica que a estrutura da HNT foi preservada após sua incorporação na matriz hidrogel. A Tabela 6 traz os principais grupos funcionais

identificados nos espectros de transmitância das amostras de GG e HNT puras, e dos compósitos GGHNT.

Tabela 6. Representação das principais bandas atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de GG e HNT puras, e dos compósitos GGHNT.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Constituinte	Grupo Funcional
3310	GG / GGHNT	Estiramento do -OH
2911	GG / GGHNT	Estiramento de -CH
1600	GG / GGHNT	Estiramento assimétrico -COO
1402	GG / GGHNT	Estiramento simétrico -COO
1020	GG / GGHNT	Estiramento de C-O
3698	HNT / GGHNT	Flexão de Al-O-OH
3622	HNT / GGHNT	Estiramento de Al-OH interno
1005	HNT	Si-O-Si
910	HNT / GGHNT	Flexão de Al-O-OH
526	HNT / GGHNT	Si-O com vibrações Al-O-Si
459	HNT / GGHNT	Flexão de Si-O

4.5. Impressão dos *scaffolds* de GGLP e GGHNT

Com base nos ensaios reológicos, considerando os valores dos módulos de G' e G'', e a viscosidade complexa, foram selecionadas três compósitos de cada hidrogel que apresentaram um melhor desempenho para bioimpressão 3D, a saber: LP 5% - GG 1,5%, LP 5% - GG 2,0%, LP 5% - GG 2,5%, GG 3% - HNT 0,5%, GG 3% - HNT 1,0% e GG 3% - HNT 1,5%. A partir do *software* de impressão Slic3r, o modelo 3D foi delineado, neste caso, um quadrado, com a determinação da densidade de preenchimento, definida como a porcentagem volumétrica da parte interna contendo material (neste estudo, fixada em 15%), além da configuração dos espaços vazios, distribuídos em quadrados no interior da estrutura principal, conforme pode ser observado na Figura 26.

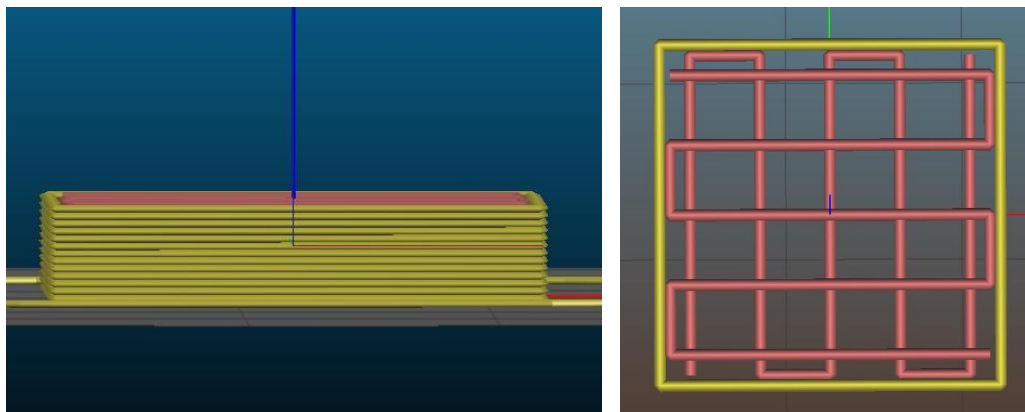


Figura 26. Imagens computacionais geradas pelo *software* de impressão Slic3r do objeto modelo a ser impresso e a prévia da impressão dado pelo programa.

Os principais parâmetros ajustáveis na impressora incluíram: temperatura do material e da plataforma (nesse caso, 25 °C), essenciais para o controle da fluidez; o multiplicador de extrusão, responsável por regular a pressão aplicada ao pistão para extrusão da amostra, dependente diretamente das propriedades viscoelásticas do material; o diâmetro do bico de impressão (neste caso, 0,41 mm), que influencia o cálculo da vazão em mm³/min; a altura das camadas e a velocidade de impressão, parâmetros que determinaram a quantidade de material depositada por minuto (mm/min).

Após a definição dos parâmetros, deu-se início ao processo de impressão, possibilitando a observação do percurso do cabeçote, da velocidade de deslocamento e da sobreposição das camadas na formação da estrutura tridimensional. A impressão dos hidrogéis foi realizada conforme ilustrado na Figura 27. Nessa figura, os hidrogéis são apresentados em três estágios distintos: na primeira imagem, observa-se o material no momento em que é extrudado da seringa (Fig 27 a,d,g; j, m e p); na segunda, dez minutos após a impressão (Fig 27 b, e, h; k, n, q); e, na terceira, após o processo de reticulação com CaCl₂ (Fig 27 c, f, i; l, o, r).

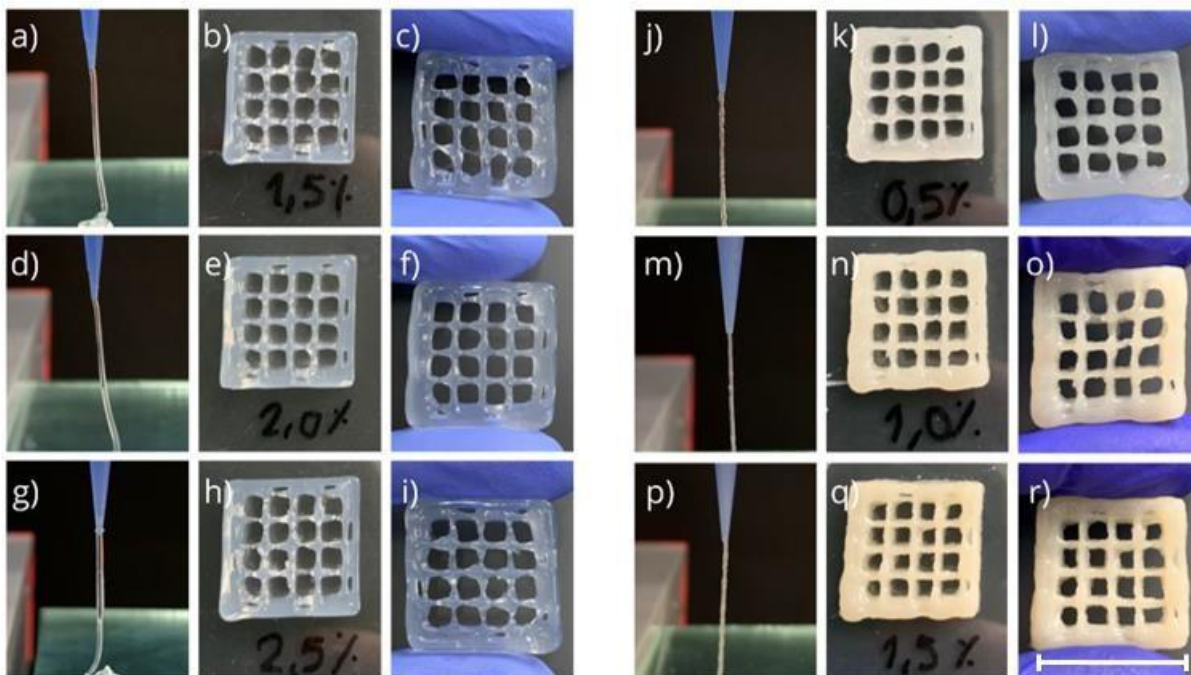


Figura 27. As figuras de a) a i) correspondem aos HCs GGLP, sendo a), b) e c) a concentração de LP 5% - GG 1,5%, d), e) e f) LP 5% - GG 2,0% e g), h) e i) LP 5% - GG 2,5%. As figuras a), d) e g) são referentes ao momento em que o hidrogel sai pelo bico da seringa, b), e) e h) correspondem ao hidrogel logo após a impressão, e c), f) e i) mostram o momento após a reticulação. Já as figuras de j) a r) correspondem aos HCs GGHNT, sendo j), k) e l) a concentração de GG 3% - HNT 0,5%, m), n) e o) GG 3% - HNT 1,0%, e p), q) e r) GG 3% - HNT 1,5%. As figuras j), m) e p) são referentes ao momento em que o hidrogel sai pelo bico da seringa, k), n) e q) correspondem ao hidrogel logo após a impressão, e l), o) e r) mostram o momento após a reticulação. A barra de escala equivale a 2 cm.

De forma complementar aos dados obtidos nos estudos reológicos, foi evidenciado que o material possuía características adequadas para o processo de impressão, uma vez que foi extrudado na forma de um filamento contínuo, ao invés de gotas, uma propriedade fundamental para a deposição sucessiva de camadas. Essa capacidade de formação de filamento pela biotinta está relacionada ao equilíbrio entre a tensão superficial e as forças elásticas, viscosas e inerciais (CLASEN *et al.*, 2021).

Outra característica que pôde ser observada, é que para todas as concentrações de HCs, as estruturas impressas mantiveram o formato após a impressão, mantendo semelhança com o modelo digitalmente gerado, sem apresentarem deformações ou colapsos na estrutura em até 10 minutos após a impressão. A alta fidelidade de forma é crucial não apenas para gerar estruturas reproduzíveis, mas também para suportar a absorção de nutrientes e a eliminação de resíduos de forma homogênea, quando necessário, devido a uma estrutura impressa porosa macroscópica relativamente homogênea, características estas que estão relacionadas às propriedades não newtonianas e viscoelásticas das biotintas e seu comportamento de fluxo (AMORIM *et al.*, 2021).

Foi possível observar também que as camadas impressas apresentaram ótima adesão entre si, sendo esse um fator essencial para a integridade estrutural da peça impressa, contribuindo para a resistência mecânica final do hidrogel. Outra característica observada, foi que não houveram mudanças na estrutura macroscópica das estruturas impressas após o processo de reticulação com CaCl_2 , uma vez que é possível notar a similaridade entre as figuras no momento pós impressão e pós reticulação.

A impressão dos modelos resultou na formação de traços com superfícies uniformes em todas as amostras. O processo de impressão dos materiais avaliados neste estudo demonstrou sua viabilidade para aplicação na tecnologia de manufatura aditiva, garantindo fidelidade ao formato exigido por estruturas complexas. Além disso, suas propriedades podem ser ajustadas conforme a finalidade desejada para a peça.

4.6. Incorporação de *Trichoderma harzianum* nos HCs

Os conídios de *Trichoderma harzianum* foram adicionados às três concentrações de cada HC, conforme observado na Figura 28.

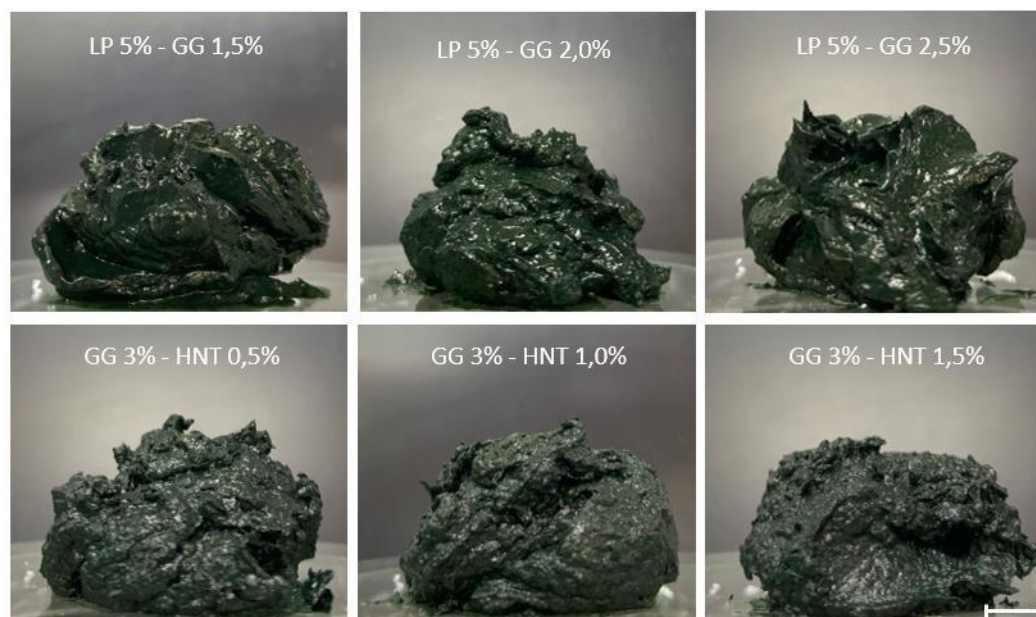


Figura 28. Incorporação dos conídios de *Trichoderma harzianum* às três concentrações distintas de cada tipo de HC. Observa-se que macroscopicamente há uma homogeneidade da distribuição dos conídios nas formulações, etapa essencial para a posterior avaliação da viabilidade fúngica. A barra de escala é equivalente a 1 cm.

É possível notar que há uma distribuição visualmente homogênea dos conídios fúngicos nas diferentes formulações nas quais eles foram adicionados. No entanto, análises complementares, como Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Pticografia devem ser realizadas a fim de se confirmar a distribuição em nível microscópico e avaliar possíveis

agregações ou encapsulamentos parciais que possam interferir na liberação e germinação dos conídios, uma vez que foi realizada uma tentativa de impressão utilizando uma bioimpressora, e observou-se que, apesar da aparência homogênea do material em nível macroscópico, ao ser colocado para imprimir em bioimpressora, foram identificadas regiões contendo apenas o hidrogel, sem a presença visível de conídios. Essa distribuição heterogênea comprometeu a homogeneidade do material durante a extrusão, resultando em falhas no processo de impressão.

Diante dessas limitações observadas, as formulações obtidas ainda requerem etapas de otimização, especialmente quanto a melhorias na homogeneidade do biofilamento, com o intuito de garantir uma distribuição uniforme dos conídios e viabilizar sua aplicação em sistemas de bioimpressão. Análises reológicas dos HCs após a incorporação dos conídios fúngicos também serão realizadas, uma vez que foi possível observar uma mudança nas características viscoelásticas dos materiais, indicando possíveis alterações na estrutura da matriz polimérica decorrentes da presença dos microrganismos.

Após a incorporação dos conídios, as amostras foram submetidas ao processo de impressão manual, conforme ilustrado na Figura 29, com o objetivo de se obter estruturas reticuladas e liofilizadas para a realização dos testes de viabilidade fúngica.

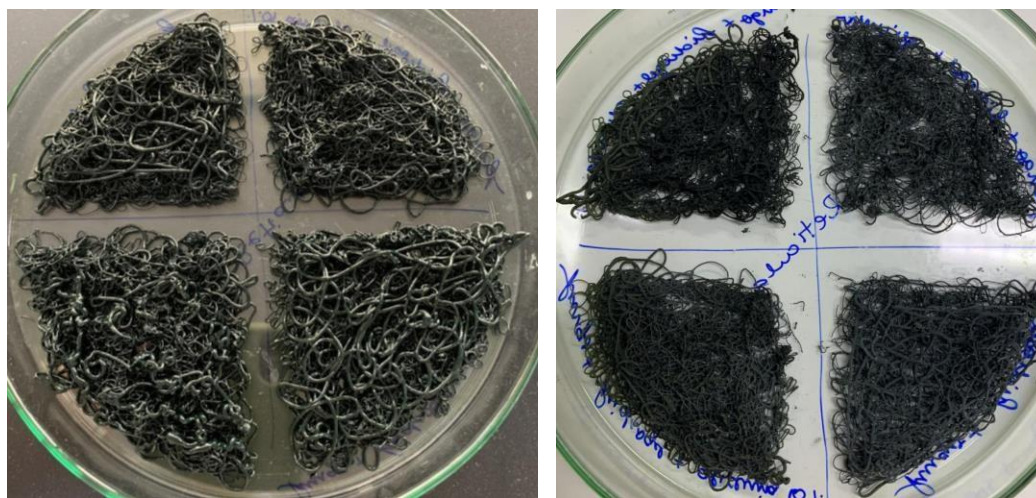


Figura 29. Amostras do HC LP 5% - GG 2,5% contendo conídios de *Trichoderma harzianum* antes (à esquerda) e após (à direita) o processo de liofilização. As amostras foram previamente submetidas à impressão manual, visando à obtenção de estruturas para os testes de viabilidade fúngica.

Foram selecionadas uma concentração representativa de cada tipo de HC para a realização dos testes de viabilidade fúngica, a saber: LP 5% – GG 2,5% e GG 3% – HNT 1,5%.

4.7. Teste de viabilidade celular fúngica

A Tabela 7 apresenta os valores de UFC/mL de *T. harzianum* nas diferentes formulações de HCs, contendo argilas LP ou HNT, após diferentes etapas de processamento. Observa-se que a viabilidade inicial dos conídios fúngicos ($8,7 \times 10^{10}$ UFC/mL) reduziu substancialmente após a incorporação nos hidrogéis e, principalmente, após os tratamentos subsequentes.

Tabela 7. Concentração de conídios fúngicos viáveis após incorporação aos HCs selecionados, frente aos quatro tipos de preparações distintas.

Amostra	Concentração (UFC/mL)
<i>Trichoderma harzianum</i>	$8,7 \times 10^{10}$
Amostra 1 - LP	$6,0 \times 10^8$
Amostra 2 - LP	$2,3 \times 10^6$
Amostra 3 - LP	$3,7 \times 10^5$
Amostra 4 - LP	$5,0 \times 10^3$
Amostra 1 - HNT	$3,6 \times 10^7$
Amostra 2 - HNT	$6,3 \times 10^6$
Amostra 3 - HNT	$3,0 \times 10^4$
Amostra 4 - HNT	$7,0 \times 10^4$

A Tabela 7 apresenta os valores de UFC/mL de *T. harzianum* nas diferentes formulações de HCs, contendo argilas LP ou HNT, após diferentes etapas de processamento. Observa-se que a viabilidade inicial dos conídios fúngicos ($8,7 \times 10^{10}$ UFC/mL) reduziu substancialmente após a incorporação nos hidrogéis e, principalmente, após os tratamentos subsequentes.

As amostras apenas impressas (Amostra 1-LP e Amostra 1-HNT) apresentaram as maiores concentrações entre os tratamentos pós-formulação, com $6,0 \times 10^8$ UFC/mL para LP e $3,6 \times 10^7$ UFC/mL para HNT. Isso indica que o processo de extrusão durante a impressão 3D, embora cause redução na viabilidade, ainda preserva uma fração considerável dos conídios. A maior viabilidade observada na amostra com argila LP sugere que esta matriz pode oferecer melhor proteção mecânica ou maior compatibilidade com os conídios em comparação à HNT.

Após a reticulação com CaCl_2 , as concentrações caíram para $2,3 \times 10^6$ UFC/mL frente ao compósito GGLP e $6,3 \times 10^6$ UFC/mL frente ao compósito GGHNT. A queda acentuada indica que o processo de reticulação exerce um efeito negativo sobre a viabilidade dos conídios. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Rahman *et al.* (2024), onde os autores investigaram como diferentes concentrações de CaCl_2 e em diferentes tempos de exposição influenciam a viabilidade fúngica em materiais baseados em biomassa de fungos

contendo cepas de *Ganoderma lucidum*. Os autores concluíram que concentrações mais elevadas de CaCl_2 reduziram significativamente o crescimento fúngico, e o tempo de exposição aos íons também afetou a viabilidade, com exposições mais longas resultando em menor viabilidade dos fungos, possivelmente por alterações osmóticas ou reações indesejadas com o agente reticulante. Boumaaza, Benkhelifa & Belkhouja, (2015), também concluíram que os efeitos do cálcio na redução da germinação dos esporos são provavelmente decorrentes de sua toxicidade, sendo que altas concentrações de CaCl_2 podem causar um estresse osmótico severo ao alterar o potencial osmótico do meio, levando à desidratação celular e consequente perda de viabilidade dos esporos e do micélio.

As amostras submetidas à impressão e subsequente liofilização, sem a etapa de reticulação (amostras 3), apresentaram uma acentuada redução na viabilidade, com concentrações de $3,7 \times 10^5$ UFC/mL para LP e $3,0 \times 10^4$ UFC/mL para HNT. Esse resultado evidencia que, embora a liofilização seja amplamente empregada na conservação de microrganismos, sua aplicação pode ser prejudicial na ausência de crioprotetores. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato de que, à medida que a temperatura se aproxima do ponto de congelamento da água, ocorre a formação de cristais de gelo, promovendo o aumento da concentração dos sais remanescentes na solução ao redor desses cristais. A solução salina altamente concentrada, associada às substâncias liberadas pelas células antes do congelamento, pode exercer efeitos deletérios sobre a integridade celular, resultando em danos irreversíveis à membrana plasmática (MORGAN *et al.*, 2006). Conforme demonstrado por Toegel *et al.* (2010), que investigaram a estabilidade de conídios de *Beauveria brongniartii* e *Metarhizium anisopliae* durante a liofilização, conídios não protegidos apresentaram sensibilidade significativa ao processo de secagem, resultando em significativa perda de viabilidade. Os autores observaram que a adição de crioprotetores como frutose, glicose e sacarose aumentou substancialmente a viabilidade dos conídios, destacando a importância desses agentes na prevenção dos danos estruturais causados pela desidratação severa.

As menores concentrações de viabilidade foram registradas nas amostras submetidas à combinação dos três processos: impressão, reticulação e liofilização. A amostra 4 – LP apresentou $5,0 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto a amostra 4 – HNT atingiu $7,0 \times 10^4$ UFC/mL. Esses dados indicam que a aplicação sequencial dos processos comprometeu significativamente a viabilidade celular dos fungos incorporados à matriz dos HCs.

4.8. Impressão dos *scaffolds* de GGLP e GGHT contendo *T. harzianum* e avaliação da liberação fúngica

Estruturas tridimensionais contendo diferentes números de camadas foram bioimpressas com o propósito de investigar de forma sistemática a influência da espessura sobre o perfil de liberação dos microrganismos presentes na matriz do hidrogel, buscando compreender se as variações estruturais poderiam interferir na difusão e na dinâmica de liberação dos agentes biológicos.

A Figura 30 apresenta as imagens dos hidrogéis GGLP contendo *T. harzianum*, bioimpressos com diferentes números de camadas (1, 4 e 8), dispostos sobre uma placa de meio de cultivo contendo ágar BDA. As estruturas foram acompanhadas e avaliadas visualmente a cada dois dias, totalizando sete, a fim de monitorar o crescimento fúngico ao longo do período experimental.

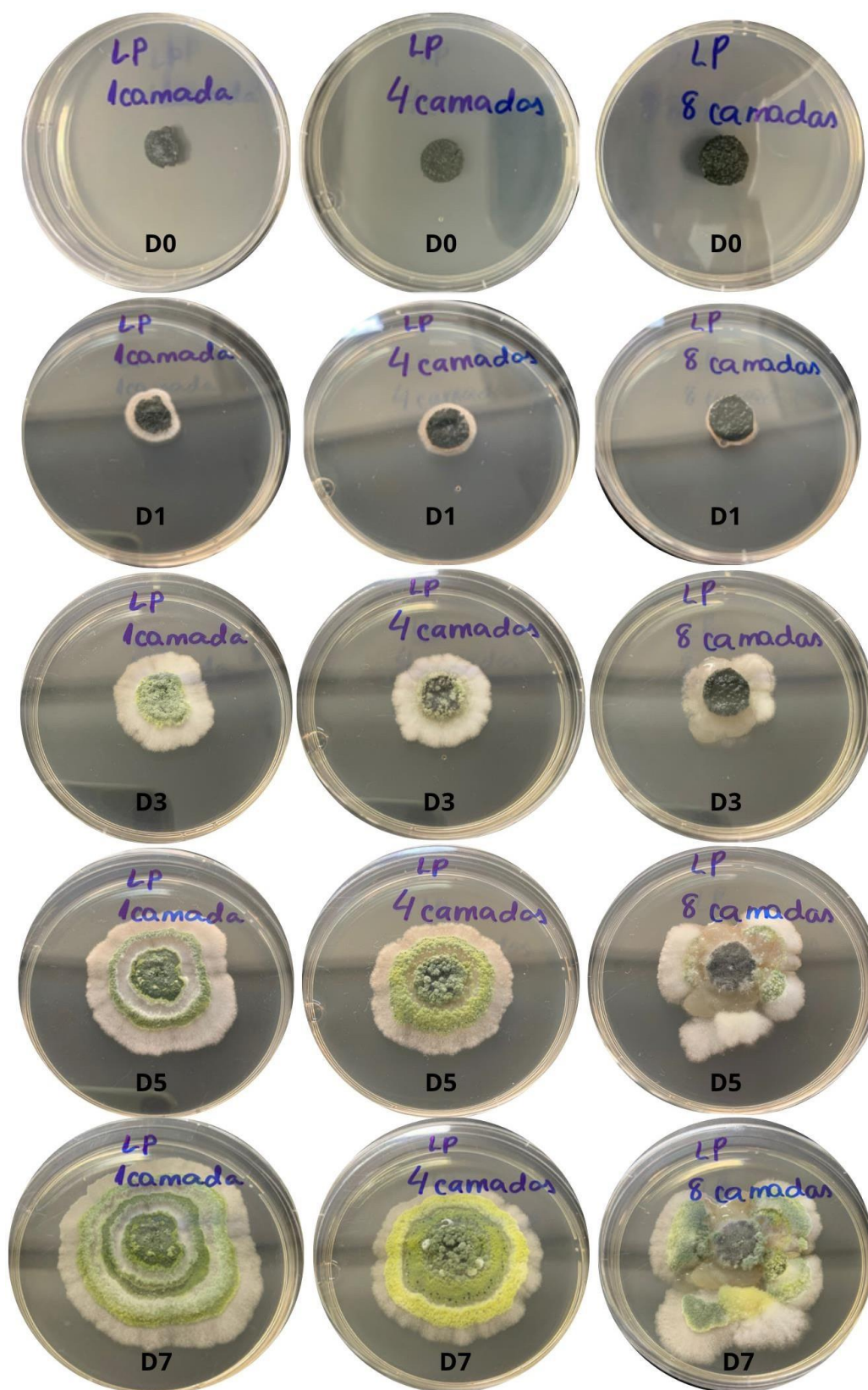


Figura 30. Hidrogéis GGLP contendo *T. harzianum* impressos em 1, 4 e 8 camadas, dispostos sobre meio de cultivo ágar batata após serem submetidos à reticulação com solução de cloreto de cálcio 0,1M. As amostras foram avaliadas no D1, D3, D5 e D7.

Foi possível observar que, no dia da inoculação (D0), as estruturas mantiveram-se íntegras e sem indícios de colonização superficial. A partir do segundo dia (D1), iniciou-se o aparecimento do micélio fúngico ao redor das matrizes impressas, sendo mais evidente nas amostras com menor número de camadas.

No terceiro dia (D3), o *T. harzianum* apresentou crescimento com desenvolvimento micelial denso e início de esporulação nas amostras de 1 e 4 camadas. Observou-se, entretanto, que na amostra contendo 8 camadas formou-se uma região de aspecto gelatinoso ao redor do hidrogel, possivelmente decorrente da remoção incompleta do CaCl₂. Essa condição pode ter alterado as propriedades físico-químicas locais do material, interferindo no desenvolvimento fúngico; portanto, sugere-se que o resultado obtido para essa amostra deve ser desconsiderado nas análises comparativas.

No quinto dia (D5), as amostras apresentaram crescimento significativo, indicando que, independentemente da quantidade de camadas impressas, o hidrogel GGLP é capaz de sustentar a viabilidade e o desenvolvimento do fungo ao longo do período de tempo avaliado. Por fim, no sétimo dia de avaliação (D7), foi possível observar que o micélio cobriu grande parte da superfície da placa, e pôde ser observado de um crescimento fúngico em camadas, característico da organização estrutural do fungo. Esse padrão de crescimento micelial também foi observado por Stange *et al.* (2023). O crescimento homogêneo observado entre as diferentes espessuras impressas indica que, dentro das características avaliadas nesse estudo, a variação no número de camadas não exerceu influência significativa sobre o desenvolvimento fúngico em meio de cultivo BDA.

Esse comportamento sugere que a difusão de nutrientes e gases através da matriz de GG e LP foi adequada mesmo nas estruturas mais espessas, permitindo a manutenção da viabilidade fúngica e a colonização efetiva do meio de cultura. Porém, estudos complementares conduzidos em condições de campo ou sob períodos mais prolongados de incubação são necessários para confirmar se o comportamento observado *in vitro* se mantém em ambientes com maior complexidade e variabilidade de fatores físico-químicos.

O mesmo experimento foi realizado com os hidrogéis GGHT contendo *T. harzianum*, conforme pode ser observado na Figura 31.

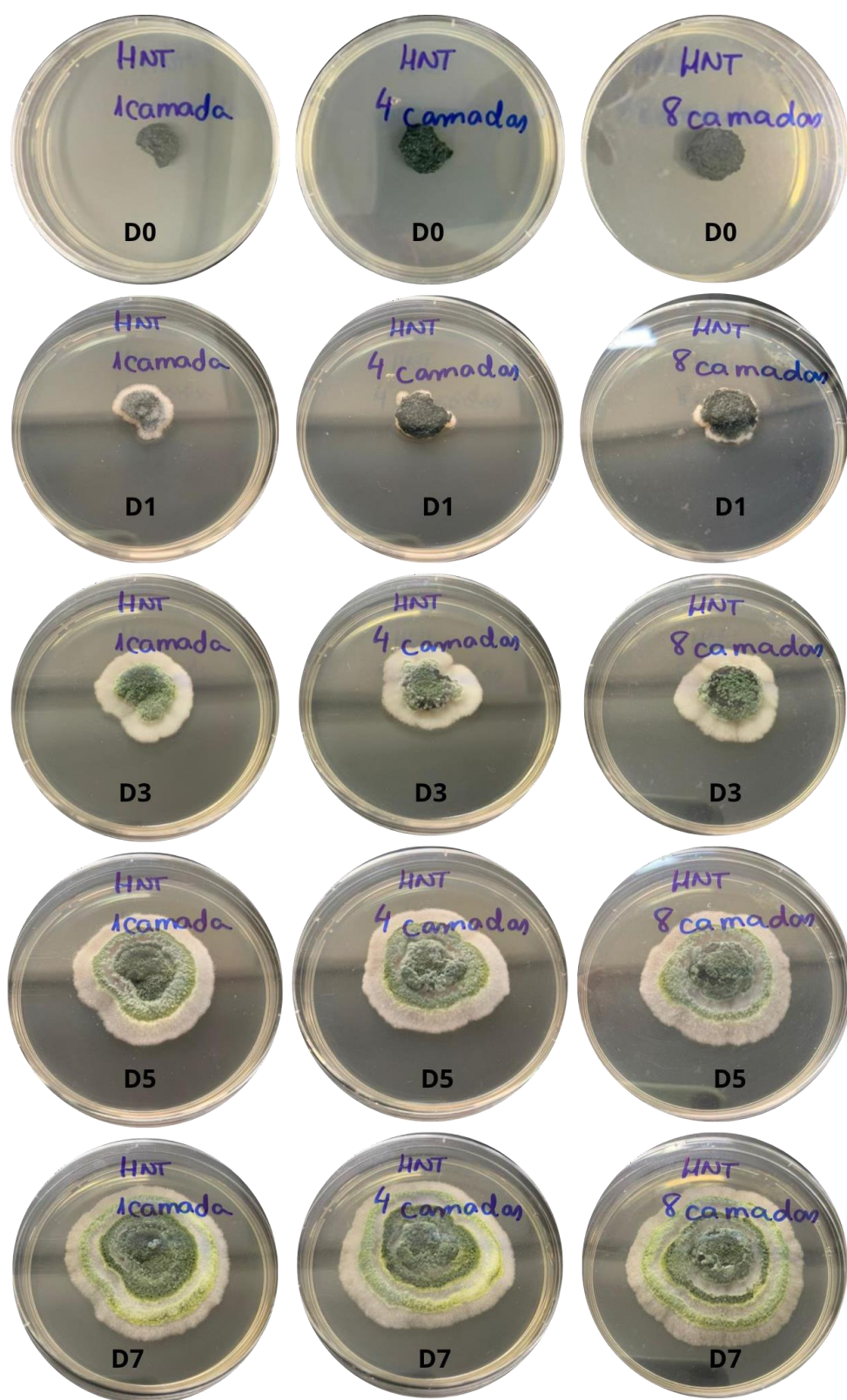


Figura 31. Hidrogéis GGHT contendo *T. harzianum* impressos em 1, 4 e 8 camadas, dispostos sobre meio de cultivo ágar batata após serem submetidos à reticulação com solução de cloreto de cálcio 0,1M. As amostras foram avaliadas no D1, D3, D5 e D7.

Para as amostras de hidrogéis GGHNT bioimpressas contendo *T. harzianum*, observou-se um padrão de crescimento micelial semelhante ao descrito para o hidrogel GGLP. No momento da inoculação (D0), as estruturas apresentaram-se visualmente íntegras, uniformes e sem sinais de colonização superficial.

No primeiro dia de incubação (D1), iniciou-se o desenvolvimento micelial ao redor das matrizes, se apresentando de forma mais densa no terceiro dia (D3), onde é possível observar um micélio bem definido e início de esporulação em todas as amostras, sugerindo que a matriz híbrida de GG e HNT oferece um ambiente favorável para a proliferação fúngica.

A partir do quinto dia (D5), foi possível observar uma expansão expressiva do micélio, que passou a recobrir progressivamente a superfície do meio de cultura até o sétimo dia (D7), onde o crescimento micelial apresentava-se extenso, contínuo e homogêneo, evidenciando que o hidrogel GGHNT foi capaz de sustentar a viabilidade e o desenvolvimento de *T. harzianum* ao longo de todo o período experimental.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem o crescimento e liberação de *T. harzianum* a partir de hidrogéis bioimpressos, com composições distintas ou semelhantes às utilizadas neste trabalho. Isso reforça o caráter inédito da abordagem proposta e evidencia a necessidade de avanços na investigação de sistemas bioimpressos contendo microrganismos, incluindo aqueles aplicados ao controle biológico, de modo que trabalhos futuros possam consolidar parâmetros comparativos e ampliar o entendimento sobre o desempenho dessas plataformas em diferentes contextos experimentais.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que, em relação às propriedades reológicas, tanto os hidrogéis de GG pura quanto os HCs GGLP e GGHNT demonstraram comportamento típico de gel, com módulo G' superior ao módulo G'' , característica de um comportamento predominantemente elástico, que é desejável para aplicações em impressão 3D. A adição de LP e HNT reforçou significativamente a estrutura dos géis. Enquanto o hidrogel de GG puro apresentou G' de 657 Pa, a formulação LP 5% - GG 2,5% alcançou G' de 4670 Pa e o HC GG 3% - HNT 1,5% atingiu G' de 2850 Pa, evidenciando o papel das argilas como agentes de reforço da matriz polimérica. Os resultados obtidos para ambos os tipos de HCs demonstraram um comportamento de fluido pseudoplástico, ideal para

aplicações em impressão 3D, uma vez que as amostras apresentaram a diminuição da viscosidade com o aumento da frequência angular.

Resultados de análise termogravimétrica evidenciaram que a incorporação de LP e HNT alterou significativamente o perfil térmico dos hidrogéis, indicando a interação entre a GG e as argilas, que resultam na formação de compósitos com comportamento térmico distinto e maior estabilidade nas faixas de temperatura analisadas.

Já os resultados obtidos através das análises de FT-IR confirmaram a presença dos principais grupos funcionais característicos da GG e da LP nos HCs GGLP, e dos grupos funcionais característicos da GG e da HNT nos HCs GGHNT, evidenciando a incorporação das argilas na estrutura da matriz polimérica e sugerindo a formação de interações entre os componentes na estrutura dos hidrogéis.

Os testes de impressão 3D demonstraram que os HCs apresentaram extrusão contínua em forma de filamento, boa adesão entre camadas e alta fidelidade de forma, sem colapsos ou deformações após a impressão, mantendo o formato do protótipo, antes e após o processo de reticulação com CaCl_2 , evidenciando estabilidade macroscópica e estrutural.

Testes de viabilidade demonstraram que cada etapa de processamento — impressão, reticulação e liofilização — impactou negativamente na viabilidade dos conídios de *T. harzianum* incorporados aos hidrogéis compostos. A impressão 3D, embora reduza a viabilidade, ainda mantém uma quantidade significativa de conídios viáveis, especialmente nas formulações com argila LP. A reticulação com CaCl_2 promoveu queda expressiva na viabilidade, possivelmente por efeitos osmóticos ou reações adversas, com a argila HNT apresentando maior capacidade de mitigação desses efeitos. A liofilização, por sua vez, revelou-se especialmente prejudicial na ausência de crioprotetores, resultando em perdas acentuadas de viabilidade. A combinação de todas as etapas resultou em menores índices de viabilidade, evidenciando a necessidade de ajustes nas condições de processamento e formulação para preservar a integridade dos microrganismos.

Os resultados obtidos para os hidrogéis GGLP e GGHNT bioimpressos contendo *T. harzianum* demonstram que, independentemente da espessura ou do número de camadas das plataformas impressas, ambas as matrizes foram capazes de manter a viabilidade fúngica e sustentar o desenvolvimento micelial ao longo do período experimental de modo semelhante. Porém, experimentos adicionais e estudos em condições mais complexas, como sistemas que simulem o solo ou ambientes naturais, serão essenciais para verificar se as características observadas *in vitro* se mantêm em cenários com maior variabilidade físico-química.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente estudo indicam caminhos promissores para investigações complementares, que poderão contribuir para a obtenção de dados mais abrangentes e robustos. Nesse sentido, podem ser realizadas caracterizações morfológicas e estruturais, como Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Pticografia, com o objetivo de analisar a morfologia superficial dos HCs e a distribuição dos conídios fúngicos na matriz polimérica. Diante dos efeitos adversos observados nas etapas de processamento em relação à viabilidade dos conídios de *T. harzianum* nos HCs, há a necessidade de um aprofundamento no estudo da otimização das formulações e condições de preparo dos HCs, através da inclusão de crioprotetores na formulação, o que pode ser uma estratégia promissora para mitigar os danos causados pela liofilização. Além disso, testes com reticulantes alternativos ao cloreto de cálcio poderão contribuir para maior preservação celular. Complementarmente, devem ser conduzidos testes de exposição dos HCs à radiação UV e a diferentes temperaturas, simulando condições do ambiente do solo, a fim de avaliar sua resistência e funcionalidade. Ensaio de tempo de prateleira, com exposição dos HCs a distintas faixas de temperatura, também são importantes para verificar a estabilidade das formulações ao longo do tempo, bem como a preservação da viabilidade dos conídios de *T. harzianum* em condições simuladas de armazenamento. Além disso, estudos complementares conduzidos em condições de campo, e por períodos mais prolongados de incubação, são necessários para confirmar se o comportamento de crescimento fúngico após impressão 3D observado *in vitro* se mantém em ambientes com maior complexidade e variabilidade de fatores físico-químicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADROVER, A., PAOLICELLI, P., PETRALITO, S., DI MUZIO, L., TRILLI, J., CESA, S., THO, I., CASADEI, M. A. Gellan gum/laponite beads for the modified release of drugs: Experimental and modeling study of gastrointestinal release. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 4, p. 187, 2019.
- AIT-LAHSEN, H., SOLER, A., REY, M., DE LA CRUZ, J., MONTE, E., LLOBELL, A. An antifungal exo- α -1, 3-glucanase (AGN13. 1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 12, p. 5833-5839, 2001.
- ALHARBI, H. Y. *et al.* Synthesis and characterization of gellan gum-based hydrogels for drug delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 258, p. 128828, 2024.
- ALMEIDA, A.I. A. R. *et al.* Enhanced polyacrylamide polymer hydrogels using nanomaterials for water shutoff: Morphology, thermal and rheological investigations at high temperatures and salinity. *Journal of Molecular Liquids*, v. 405, p. 125041, 2024.

ALVES, R. *et al.* Solid polymer electrolytes based on gellan gum and ionic liquid for sustainable electrochromic devices. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 14, n. 13, p. 15494-15503, 2022.

ALVES, S.B.; HADDAD, M.L.; FAION, M.; BAPTISTA, G.C.; ROSSI ZALAF, L.S. Novo índice biológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. *SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO*, 10. 2007, Brasília. Resumos. Brasília: Embrapa, 2007. CD-ROM.

AMORIM, P. A. *et al.* Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, v. 22, p. e00129, 2021.

ARAT, R.; UYANIK, N. Surface modification of nanoclays with styrene-maleic anhydride copolymers. *Natural resources*, v. 8, n. 3, p. 159-171, 2017.

AYAZ, M. *et al.* Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules*, v. 28, n. 18, p. 6735, 2023.

AZIZ QURESHI, A.; VINEELA, V.; VIMALA DEVI, P. S. Sodium humate as a promising coating material for microencapsulation of *Beauveria bassiana* conidia through spray drying. *Drying Technology*, v. 33, p. 162–168, 2015. DOI: 10.1080/07373937.2014.938814.

BACELAR, A. H. *et al.* Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, n. 37, p. 6164-6174, 2016.

BAROT, T; RAWTANI, D.; KULKARNI, P. Physicochemical and biological assessment of silver nanoparticles immobilized Halloysite nanotubes-based resin composite for dental applications. *Heliyon*, v. 6, n. 3, 2020.

BENÍTEZ, T., RINCON, A. M., LIMON, M. C., CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International microbiology*, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BRETAS, R. E. S., D'ÁVILA, M. A. *Reologia de polímeros fundidos*. (EdUFSCar, 2005).

BODENBERGER, N., KUBICZEK, D., HALBGEBAUER, D., RIMOLA, V., WIESE, S., MAYER, D., ALFONSO, A. A. R., STANDKER, L., STENGER, S., ROSENAU, F. Lectin-functionalized composite hydrogels for “capture-and-killing” of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomacromolecules*, v. 19, n. 7, p. 2472-2482, 2018.

BONATERRA, Anna *et al.* Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms*, v. 10, n. 9, p. 1759, 2022.

BOM, S. *et al.* On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 615, p. 121506, 2022.

BONIFACIO, M. A., GENTILE, P., FERREIRA, A. M., COMETA, S., DE GIGLIO, E. Insight into halloysite nanotubes-loaded gellan gum hydrogels for soft tissue engineering applications. *Carbohydrate polymers*, v. 163, p. 280-291, 2017.

BOUMAAZA, B., BENKHELIFA, M., BELKHOUDJA, M. Effects of two salts compounds on mycelial growth, sporulation, and spore germination of six isolates of *Botrytis cinerea* in the western north of Algeria. *International Journal of Microbiology*, v. 2015, n. 1, p. 572626, 2015. BRASIL.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. 2019a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em 12/03/2024.

- CAI, Y., CHANG, S. Y., GAN, S. W., MA, S., LU, W. F., YEN, C. C. Nanocomposite bioinks for 3D bioprinting. *Acta biomaterialia*, v. 151, p. 45-69, 2022.
- CLASEN, C. *et al.* Dispensing of rheologically complex fluids: The map of misery. *AIChE Journal*, v. 58, n. 10, p. 3242-3255, 2012.
- CHET, I., INBAR, J., HADAR, Y. Fungal antagonists and mycoparasites. 1997.
- CHENG, H. *et al.* Thermal analysis and infrared emission spectroscopic study of halloysite–potassium acetate intercalation compound. *Thermochimica Acta*, v. 511, n. 1-2, p. 124-128, 2010.
- DANIEL, L. M.; FROST, R. L.; ZHU, H. Y. Edge-modification of laponite with dimethyl-octylmethoxysilane. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 321, n. 2, p. 302-309, 2008.
- DA SILVA, P.R.Q. Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil. Tese de doutorado, Brasília, UnB, 130p., 2000.
- DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. *Carbohydrate polymers*, v. 157, p. 1-8, 2017.
- DAS, A. *et al.* A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers. *Polymer Bulletin*, v. 80, n. 7, p. 7247-7312, 2023.
- DARAIE, M. *et al.* Investigation of halloysite nanotubes and Schiff base combination with deposited copper iodide nanoparticles as a novel heterogeneous catalytic system. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 23658, 2021.
- DENTON, O., WAN, Y., BEATTIE, L., JACK, T., MCGOLDRICK, P., MCALLISTER, H., SHU, W. Understanding the role of biofilms in acute recurrent tonsillitis through 3D bioprinting of a novel gelatin-PEGDA hydrogel. *Bioengineering*, v. 11, n. 3, p. 202, 2024.
- DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CURY, B. S. F. Mucin-polysaccharide interactions: A rheological approach to evaluate the effect of pH on the mucoadhesive properties. *International journal of biological macromolecules*, v. 149, p. 234-245, 2020.
- DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P., GARCIA, L. M. B., RODRIGUES, C., CAMARA, M.C., DE MELO PEREIRA, G. V., DE OLIVEIRA, J., SOCCOL, C. R. Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry. *AIMS microbiology*, v. 3, n. 3, p. 629, 2017.
- DURGUT, E.; ÇINAR, M.; ÖZDEMİR, O. An overview of halloysite mineral. *Scientific Mining Journal*, v. 62, n. 4, p. 175-182, 2023.
- DURGUT, E. *et al.* Effect of blunging process on purification of halloysite ore from ferrous impurities by dry magnetic separation. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, v. 60, n. 2, 2024.
- FERRARI, P. C.; ARAUJO, F. F.; PIANARO, S. A. Halloysite nanotubes-polymeric nanocomposites: characteristics, modifications and controlled drug delivery approaches. *Cerâmica*, v. 63, n. 368, p. 423-431, 2017.
- FIALHO, A. M. *et al.* Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 79, p. 889-900, 2008.
- FONTES, E. M. G., VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológico de pragas da agricultura. Embrapa, 2020.

FORBES. Startup de agricultura vertical propõe separar os alimentos da natureza: Rasmus Bjerngaard, CEO da Nextfood, diz que modelo de negócio que deve gerar US\$ 4,16 bilhões neste ano permite uma cadeia de fornecimento de alimentos totalmente nova. Publicado por Jennifer Kite-Powell, em 10 de novembro de 2022. Disponível em: <<https://forbes.com.br/forbesagro/2022/11/startup-de-agricultura-vertical-propoe-separar-alimentos-e-natureza/>>. Acesso em 24/04/2025.

FRANCHETTI, S. M. M., MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, v. 29, p. 811-816, 2006.

GAAZ, T. S. *et al.* The impact of halloysite on the thermo-mechanical properties of polymer composites. *Molecules*, v. 22, n. 5, p. 838, 2017.

GOMES, D., BATISTA-SILVA, J. P., SOUSA, A., PASSARINHA, L. A. Progress and opportunities in Gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 311, p. 120782, 2023.

GUIMARÃES, A. M. F.; CIMINELLI, V. S. T.; VASCONCELOS, W. L. Surface modification of synthetic clay aimed at biomolecule adsorption: synthesis and characterization. *Materials Research*, v. 10, p. 37-41, 2007.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. Trichoderma species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HERRADA-MANCHÓN, Helena; FERNÁNDEZ, Manuel Alejandro; AGUILAR, Enrique. Essential guide to hydrogel rheology in extrusion 3D printing: how to measure it and why it matters?. *Gels*, v. 9, n. 7, p. 517, 2023.

HERZOG, J., FRANJE, L., LAI, Y., ROSSI, P. G., SACHTLEBEN, J., WEUSTER-BOTZ, D. 3D bioprinting of microorganisms: principles and applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, p. 1-19, 2024.

HUANG, X. *et al.* Laponite: a promising nanomaterial to formulate high-performance water-based drilling fluids. *Petroleum Science*, v. 18, p. 579-590, 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 12: Sample preparation and reference materials”, 4ed, ISO 10993-12, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”, 3st ed, ISO 10993-5, 2009.

JUNCU, G., STOICA-GUZUN, A., STROESCU, M., ISOPENCU, G., JINGA, S. I. Drug release kinetics from carboxymethylcellulose-bacterial cellulose composite films. *Int J Pharm. International Journal of Pharmaceutics*, v. 510, n. 2, p. 485–492, 2016.

KABIR, S. B. *et al.* Progress in biohythane production from microalgae-wastewater sludge co-digestion: an integrated biorefinery approach. *Biotechnology Advances*, v. 57, p. 107933, 2022.

KALEDOVA, A. *et al.* Applications of Clays in Nanocomposites and Ceramics. *Minerals*, v. 14, n. 1, p. 93, 2024.

KALIA, V. C. *et al.* Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. *Biotechnology advances*, v. 37, n. 1, p. 68-90, 2019.

- KAMBLE, R., GHAG, M., GAIKAWAD, S., PANDA, B. K. Halloysite nanotubes and applications: a review. *Journal of advanced scientific research*, v. 3, n. 02, p. 25-29, 2012.
- KHEDHER, S. Bem., MEJDOUB-TRABELSI, B., TOUNSI, S. Biological potential of subtilis V26 for the control of Fusarium wilt and tuber dry rot on potato caused by Fusarium species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, v. 152, p. 104444, 2021.
- KOEHLER, J. K. *et al.* Preparation of nanosized pharmaceutical formulations by dual centrifugation. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 11, p. 1519, 2023.
- KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, v. 10, p. 845, 2019.
- KUMBAR, B., MAHMOOD, R., NAGESHA, S. N., NAGARAJA, M. S., PRASHANT, D. G., KERIMA, O. Z., CHAVAN, M. Field application of Bacillus subtilis isolates for controlling late blight disease of potato caused by Phytophthora infestans. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 22, p. 101366, 2019.
- LAMEIRINHAS, N. S., TEIXEIRA, M. C., CARVALHO, J. P., VALENTE, B. F., PINTO, R. J., OLIVEIRA, H., LUÍS, J. L., PIRES, L., OLIVEIRA, J. M., VILELA, C., FREIRE, C. S. R. Nanofibrillated cellulose/gellan gum hydrogel-based bioinks for 3D bioprinting of skin cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 229, p. 849-860, 2023.
- LANNA FILHO, R., FERRO, H. M., PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por Bacillus subtilis, *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v.4, n.2, p.13, 2010.
- LEE, Ming-Wei *et al.* Photocrosslinkable gellan gum film as an anti-adhesion barrier. *Carbohydrate polymers*, v. 90, n. 2, p. 1132-1138, 2012.
- LIU, C. P.; LIU, S. DA. Low-temperature spray drying for the microencapsulation of the fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology*, v. 27, p. 747-753, 2009. DOI: 10.1080/07373930902828005.
- LIU, X.; BHATIA, S. R. Laponite® and Laponite®-PEO hydrogels with enhanced elasticity in phosphate-buffered saline. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 26, n. 7, p. 874-879, 2015.
- LOC, N. H., HUUY, N. D., QUANG, H. T., LAN, T. T., THU HA, T. T. Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. *Mycology*, v. 11, n. 1, p. 38-48, 2020.
- LUCON, C. M. M., CHAVES, A. L. R., BACILIERI, S. Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. 2014.
- MACHADO, D. F. M., PARZIANELLO, F. R., DA SILVA, A. C. F., ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MAGALHÃES, L. S. S. M. *et al.* Nanocomposite hydrogel produced from PEGDA and laponite for bone regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, n. 2, p. 53, 2022.
- MARIN, M. M. *et al.* Development of new collagen/clay composite biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 1, p. 401, 2021.
- MASSING, Ulrich; CICKO, Sanja; ZIROLI, Vittorio. Dual asymmetric centrifugation (DAC) - A new technique for liposome preparation. *Journal of controlled release*, v. 125, n. 1, p. 16-24, 2008.

- MATSUKAWA, S., WATANABE, T. Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low-and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurements. *Food Hydrocolloids*, v. 21, n. 8, p. 1355-1361, 2007.
- MEZGER, T. G. *The Rheology Handbook : 4th Edition*. (Vincentz Network, 2014).
- MEENA, Rishi Kesh; MISHRA, Preeti. Bio-pesticides for agriculture and environment sustainability. *Resources use efficiency in agriculture*, p. 85-107, 2020.
- MIAO, S., ZHOU, J., LIU, B., LEI, X., WANG, T., HAO, X., CHENG, P., WU, H., SONG, Y., PEI, G., BI, L. A 3D bioprinted nano-laponite hydrogel construct promotes osteogenesis by activating PI3K/AKT signaling pathway. *Materials Today Bio*, v. 16, p. 100342, 2022.
- MIYOSHI, E., TAKAYA, T., NISHINARI, K. Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 30, n. 2-3, p. 109-119, 1996.
- MIYOSHI, E., NISHINARI, K. Rheological and thermal properties near the sol-gel transition of gellan gum aqueous solutions. *Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum*. Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 68-82.
- MORAES, J. D. D., BERTOLINO, S. R. A., CUFFINI, S. L., DUCART, D. F., BRETZKE, P. E., LEONARDI, G. R. Clay minerals: Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 534, n. 1-2, p. 213-219, 2017.
- MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. **Preservation of micro-organisms by drying: a review**. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.
- MORRIS, E. R., NISHINARI, K., RINAUDO, M. Gelation of gellan—a review. *Food Hydrocolloids*, v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.
- MUÑOZ-CELAYA, A. L., ORTIZ-GARCÍA, M., VERNON-CARTER, E. J., JAUREGUI-RINCÓN, J., GALINDO, E., & SERRANO-CARREÓN, L. Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate polymers*, v. 88, n. 4, p. 1141-1148, 2012.
- MUTHUKUMAR, T., SONG, J. E., KHANG, G. Biological role of gellan gum in improving scaffold drug delivery, cell adhesion properties for tissue engineering applications. *Molecules*, v. 24, n. 24, p. 4514, 2019.
- NASCIMENTO, V. C., RODRIGUES-SANTOS, K. C., CARVALHO-ALENCAR, K. L., CASTRO, M. B., KRUGER, R. H., LOPES, F. A. C. Trichoderma: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins. *Brazilian Journal of Biology*, v. 82, p. e260161, 2022.
- OSMALEK, T., FROELICH, A., TASAREK, S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International journal of pharmaceutics*, v. 466, n. 1-2, p. 328-340, 2014.
- PACELLI, S., PAOLICELLI, P., MORETTI, G., PETRALITO, S., DI GIACOMO, S., VITALONE, A., CASADEI, M. A. Gellan gum methacrylate and laponite as an innovative nanocomposite hydrogel for biomedical applications. *European Polymer Journal*, v. 77, p. 114-123, 2016.
- PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Application of free computational program in experimental design: a tutorial. *Química Nova*, v. 41, p. 1061–1071, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170254.

RAWTANI, D. *et al.* Development of a novel ‘nanocarrier’ system based on Halloysite Nanotubes to overcome the complexation of ciprofloxacin with iron: An in vitro approach. *Applied Clay Science*, v. 150, p. 293-302, 2017.

SETTER, O. P.; SEGAL, E. Halloysite nanotubes–the nano-bio interface. *Nanoscale*, v. 12, n. 46, p. 23444-23460, 2020.

SILVA, J. M. *et al.* Inorganic-organic bio-nanocomposite films based on Laponite and Cellulose Nanofibers (CNF). *Applied Clay Science*, v. 168, p. 428-435, 2019.

SILVA, B. C.; CANOVAS, B. A.; ALMEIDA, G. L. G. de; ANTÔNIO, L. N. de; FERNANDEZ, R. D. Brazilian agribusiness: Investment in vertical farming as a competitive advantage. *Seven Editora*, [S. l.], 2024. Disponível em: <https://sevenpublicacoes.com.br/editora/article/view/3357>. Acesso em: 24/04/2025.

PACELLI, S. *et al.* Gellan gum methacrylate and laponite as an innovative nanocomposite hydrogel for biomedical applications. *European Polymer Journal*, v. 77, p. 114-123, 2016.

PRAJAPATI, V. D., JANI, G. K., ZALA, B. S., KHUTLIWALA, T. A. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate polymers*, v. 93, n. 2, p. 670-678, 2013.

PINTO, A. P. F., FILHO, A. B., ALMEIDA, J. E. M., WENZEL, I. M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 47, p. 1673-1680, 2012.

RAHMAN, Al Mazedur *et al.* Effects of Sodium Alginate and Calcium Chloride on Fungal Growth and Viability in Biomass-Fungi Composite Materials Used for 3D Printing. *Biomimetics*, v. 9, n. 4, p. 251, 2024.

SABADINI, R. C. *et al.* Hydrogels Based on Natural Polymers Loaded with Bentonite and/or Halloysite: Composition Impact on Spectroscopic, Thermal, and Swelling Properties. *Molecules*, v. 29, n. 1, p. 131, 2023.

SAKLOETSAKUN, D.; PONGJANYAKUL, T. Modification of gellan gum films by halloysite: physicochemical evaluation and drug permeation properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 43, n. 3, p. 492-501, 2017.

SAMADA, L. H.; TAMBUNAN, U. S. F. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. *Online J. Biol. Sci*, v. 20, n. 2, p. 66-76, 2020.

SANTO, K. F., DÁVILA, J. L., D'ÁVILA, M. A., RODAS, A. C. D., SILVA, J. V. L. D., & DAGUANO, J. K. M. B. Estudo da reologia de hidrogéis compósitos de PEG-Laponita-alginato visando impressão 3D baseada em extrusão. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 27, p. e13174, 2022.

SANTOS, A. C. *et al.* Halloysite clay nanotubes for life sciences applications: From drug encapsulation to bioscaffold. *Advances in colloid and interface science*, v. 257, p. 58-70, 2018.

STADNIK, M. J., BETTIOL, W. Controle biológico de oídeos. Controle biológico. v.3. Jaguariúna, *Embrapa Meio Ambiente*, p. 95–112, 2020.

STANGE, P., SEIDL, S., KARL, T. *et al.* Evaluation of *Trichoderma* isolates as biocontrol measure against *Claviceps purpurea*. *Eur J Plant Pathol* 167, 651–675 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02716-w>.

- STEALEY, S. T., GAHARWAR, A. K., ZUSTIAK, S. P. Laponite-based nanocomposite hydrogels for drug delivery applications. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 6, p. 821, 2023.
- SUNER, S. *et al.* Cryogel composites based on hyaluronic acid and halloysite nanotubes as scaffold for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, v. 130, p. 627-635, 2019.
- TARIQJAVEED, M. *et al.* Role of Trichoderma as a biocontrol agent (BCA) of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 183, p. 107626, 2021.
- TEO, Zhi Wei Norman; YU, Hao. Genetic breeding for indoor vertical farming. *Sustainable Agriculture*, v. 2, n. 1, p. 13, 2024.
- TOEGEL, Stefan *et al.* Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. *Journal of invertebrate pathology*, v. 105, n. 1, p. 16-23, 2010.
- VIGATA, M., MEINERT, C., HUTMACHER, D. W., BOCK, N. Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 12, p. 1188, 2020.
- VILLARREAL-OTALVARO, C.; COBURN, J. M. Fabrication methods and form factors of gellan gum-based materials for drug delivery and anti-cancer applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 9, n. 7, p. 3832-3842, 2021.
- WANG, F.; WEN, Y.; BAI, T. The composite hydrogels of polyvinyl alcohol–gellan gum-Ca²⁺ with improved network structure and mechanical property. *Materials Science and Engineering: C*, v. 69, p. 268-275, 2016.
- WANGPRASEURT, D. *et al.* Biomimetic 3D living materials powered by microorganisms. *Trends in Biotechnology*, v. 40, n. 7, p. 843-857, 2022.
- WHITE, R. D., BAVYKIN, D. V., WALSH, F. C. The stability of halloysite nanotubes in acidic and alkaline aqueous suspensions. *Nanotechnology*, v. 23, n. 6, p. 065705, 2012.
- WU, T. *et al.* Hypoglycemic Activity of Self-Assembled Gellan Gum-Soybean Isolate Composite Hydrogel-Embedded Active Substance-Saponin. *Foods*, v. 11, n. 22, p. 3729, 2022.
- YANG, H., HUA, S., WANG, W., WANG, A. Composite hydrogel beads based on chitosan and laponite: preparation, swelling, and drug release behaviour. p. 479-490, 2011.
- YI, J. Z.; ZHANG, L. M. Studies of sodium humate/polyacrylamide/clay hybrid hydrogels. I. Swelling and rheological properties of hydrogels, *Eur Polym J* 43 (2007) 3215–3221.
- YILDIZ, H., KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, v. 72, p. 41-46, 2018.
- ZENNIFER, A., MANIVANNAN, S., SETHURAMAN, S., KUMBAR, S. G., & SUNDARAMURTHI, D. 3D bioprinting and photocrosslinking: emerging strategies & future perspectives. *Biomaterials advances*, v. 134, p. 112576, 2022.
- ZHONG, Q.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; YANG, G.; JIN, W.; PENG, D.; HUANG, Q. Correlation between 3D printability and rheological properties of biopolymer fluid: a case study of alginate-based hydrogels. *Journal of Food Engineering*, v. 370, 2024. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2024.111970.

ZIA, K. M., TABASUM, S., KHAN, M. F, AKRAM, N., AKHTER, N., NOREEN, A., ZUBER, M. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 109, p. 1068-1087, 2018.

ZHANG, S. *et al.* Mechanisms and characterization of *Trichoderma longibrachiatum* T6 in suppressing nematodes (*Heterodera avenae*) in wheat. *Frontiers in plant science*, v. 8, p. 1491, 2017.

ZHAO, Puxiang *et al.* Gold@ Halloysite nanotubes-chitin composite hydrogel with antibacterial and hemostatic activity for wound healing. *Bioactive materials*, v. 20, p. 355-367, 2023.

ZUIDEMA, J. M.; RIVET, C. J.; GILBERT, R. J.; MORRISON, F. A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 102, 1063–1073 (2014).