

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS PARA A APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE CARNE *IN VITRO* POR BIOIMPRESSÃO 3D

Palavras-Chave: BIOIMPRESSÃO 3D, HIDROGEL, PECTINA

Autores:

ISABELA MARÇAL LIMA, FEQ – UNICAMP

FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA, FEQ – UNICAMP / R-CRIO

RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA, FEQ – UNICAMP / R-CRIO

HENRIQUE AURELIANO LOURENÇO DA COSTA, FEQ – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. ÂNGELA MARIA MORAES (orientadora), FEQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O cenário crescente de impactos provenientes das mudanças climáticas e do aumento da demanda por alimentos exige alternativas sustentáveis à pecuária convencional. Nesse contexto, a produção de carne *in vitro* por bioimpressão 3D mostra-se promissora, principalmente por ser uma alternativa mais ética. O processo de produção envolve o isolamento e cultivo de células do animal cuja carne se deseja obter, seguido pela inoculação dessas células em *scaffolds*, ou suportes, para o crescimento celular. Com isso, a escolha dos materiais constituintes dos *scaffolds* é de grande importância, pois afeta diretamente o desenvolvimento das células e, por consequência, a eficácia do processo (Lee et al., 2021).

Os *scaffolds* utilizados neste estudo são hidrogéis constituídos de polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e aprovados para consumo humano: pectina, goma xantana e gelatina (Singh et al., 2023). A pectina é um polissacarídeo presente em tecidos vegetais que pode sofrer reticulação e se gelificar na presença de íons cátion bivalentes, que promovem a interação entre grupos carboxila presentes nas moléculas (Iijima et al., 2002).

Como o material produzido deve ser capaz de suportar o crescimento de células de animais, é essencial que as formulações sejam esterilizadas. Uma das alternativas viáveis para este propósito é a autoclavagem, que foi escolhida para o projeto devido à sua viabilidade técnica e econômica. Ainda que o tratamento térmico da pectina possa causar sua despolimerização (Munarin et al., 2013), sua mistura com outros polímeros biológicos pode contribuir com sua estabilização, resultando em hidrogéis com comportamento satisfatório.

A goma xantana, por sua vez, é um agente espessante comumente utilizado na indústria alimentícia e é interessante para a produção de hidrogéis devido ao seu comportamento pseudoplástico (isto é, sua viscosidade aparente diminui ao se aplicar uma tensão de cisalhamento), o que facilita a extrusão pela seringa da impressora 3D e a manutenção da forma do material extrudado após a deposição (Petri, 2015; Malda et al., 2013). Já a gelatina é essencial para a adesão celular devido à sequência de peptídeos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que apresenta (Swartz, 2021).

Portanto, para que o hidrogel seja adequado para a bioimpressão 3D, deve formar filamentos regulares quando extrudado e possuir comportamento pseudoplástico, garantindo a manutenção da forma após a extrusão. Dessa forma, testes qualitativos e de caracterização reológica são fundamentais para avaliar a potencialidade de uso das formulações produzidas.

Nesse contexto, o projeto teve por objetivo desenvolver hidrogéis com diferentes proporções de gelatina (PXG-1 com menor proporção e PXG-4 com maior proporção) e avaliar sua aplicabilidade à bioimpressão 3D por meio de análises qualitativas. O efeito na estrutura tridimensional e nas propriedades reológicas antes e após a esterilização por autoclave dos hidrogéis foi também analisado.

METODOLOGIA:

PREPARO DAS FORMULAÇÕES:

As soluções de pectina e de goma xantana foram produzidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. A gelatina, por sua vez, foi preparada em solução tampão a 37°C. As soluções foram misturadas em proporções pré-definidas utilizando seringas conectadas e posteriormente foram autoclavadas para obtenção dos hidrogéis estéreis. Por fim, as formulações foram centrifugadas a fim de se remover bolhas que pudessem influenciar nos resultados dos testes a serem realizados.

TESTES QUALITATIVOS:

Primeiramente, realizou-se o teste de extrusão, no qual cada hidrogel foi extrudado sobre uma plataforma com espaçamentos de 1 a 6 mm utilizando uma seringa acoplada a um bico de extrusão 18G (diâmetro da abertura do bico igual a 0,838 mm). Esse teste possui como objetivo analisar a estrutura tridimensional do filamento produzido, avaliando sua sustentação, espalhamento, regularidade e continuidade.

Para o teste de inversão de tubo, o hidrogel foi colocado dentro de um frasco, que foi então invertido para verificar se o material escorria pelas paredes do recipiente ao longo de 15 minutos.

Adicionalmente, foi conduzido o teste de gelificação, que consistiu na deposição do hidrogel em uma placa de 24 poços e na avaliação de sua reticulação na presença de 1 mL de solução de cloreto de cálcio a 100 mM, verificando-se a formação de discos resistentes ao manuseio após intervalos de tempo pré-definidos.

Além de se analisar as formulações autoclavadas, também foram avaliadas as formulações PXG-1 e PXG-4 não autoclavadas, com o objetivo de observar a influência do tratamento térmico nas propriedades do hidrogel. Ressalta-se que todos os testes foram realizados à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para o teste de gelificação, observou-se que as formulações não autoclavadas reticularam de forma satisfatória formando discos resistentes ao manuseio em poucos minutos após o contato com a solução de cloreto de cálcio. No entanto, após o tratamento térmico, a reticulação tornou-se insatisfatória, uma vez que não houve formação de discos estáveis mesmo após 1 hora de análise.

No teste de inversão de tubos, tanto as formulações autoclavadas quanto as não autoclavadas apresentaram resultados satisfatórios. Os hidrogéis não escoaram pelas paredes dos frascos durante o período de análise, indicando que o comportamento coesivo das formulações não foi significativamente afetado pela autoclavagem.

Para o teste de formação de filamento sobre plataforma com espaçamentos de 1 a 6 mm, como ilustrado na Figura 1, as formulações não autoclavadas apresentaram resultados mais satisfatórios. Os filamentos mantiveram sua forma ao serem extrudados pela seringa e exibiram boa uniformidade, embora a formulação PXG-4, com maior concentração de gelatina, tenha apresentado algumas irregularidades. Os hidrogéis autoclavados, no entanto, demonstraram um comportamento distinto, espalhando-se e tornando-se mais fluidos ao serem extrudados. Apesar disso, a solução PXG-4 obteve um comportamento semelhante à sua versão não autoclavada, possivelmente devido à maior proporção de gelatina na formulação.

O comportamento apresentado pela formulação PXG-1 pode ser explicado pela perda de viscosidade da pectina ao ser submetida à esterilização térmica na autoclave (Munarin et al., 2013).

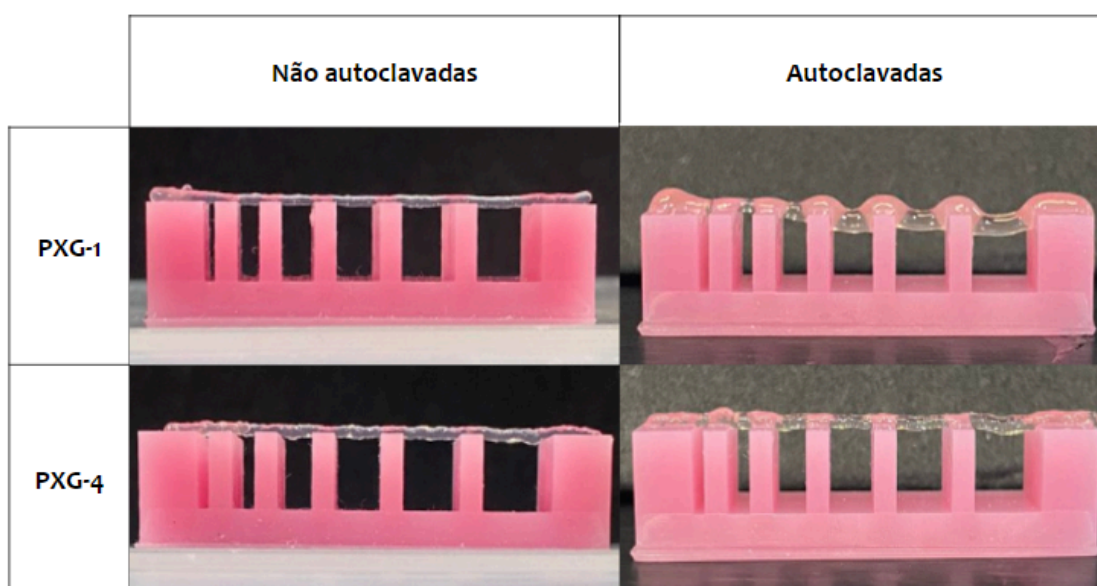


Figura 1. Teste de formação do filamento para as formulações PXG-1 e PXG-4.

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a esterilização por tratamento térmico influencia significativamente a capacidade de reticulação da pectina, resultando no espalhamento do material e na perda de sua forma após a extrusão. Portanto, torna-se necessária a busca por alternativas viáveis para a esterilização do hidrogel, uma vez que esse passo é essencial para a boa performance biológica e o consumo seguro do material produzido. A substituição da pectina por outros biopolímeros com comportamento que se mostre mais adequado após a esterilização também é uma opção.

Diante desse contexto, são planejados estudos adicionais com outros biopolímeros e proteínas que possam substituir a pectina, bem como a avaliação de diferentes métodos de esterilização das formulações PXG-1 e PXG-4 para determinar a alternativa mais viável técnica e economicamente para o objetivo proposto.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao Me. Rafael Azoubel pelas discussões produtivas, especialmente em relação aos métodos de esterilização da pectina, ao Me. Victor Marchiori de Souza pelo apoio durante as práticas laboratoriais, à Ma. Luisa Pires Vaz pelo auxílio na esterilização dos hidrogéis e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo financiamento e oportunidade.

BIBLIOGRAFIA

- Lee, K.-Y., Loh, H.-X., & Wan, A. C. A. (2021). Systems for Muscle Cell Differentiation: From Bioengineering to Future Food. *Micromachines*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/mi13010071>
- Singh, A., Kumar, V., Singh, S. K., Gupta, J., Kumar, M., Sarma, D. K., & Verma, V. (2023). Recent advances in bioengineered scaffold for in vitro meat production. *Cell and Tissue Research*, 391(2), 235–247.
- Petri, D. F. S. (2015). Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23). <https://doi.org/10.1002/app.42035>
- Swartz, E. (2021, January 29). *Cultivated meat scaffolding*. The Good Food Institute. <https://gfi.org/science/the-science-of-cultivated-meat/deep-dive-cultivated-meat-scaffolding/>
- Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., Groll, J., & Hutmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, 25(36), 5011–5028.
- Iijima, M., Hatakeyama, T., Nakamura, K., Hatakeyama, H. (2002). Effect of Annealing on Calcium Pectin Gel Formation by Thermomechanical Analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 70, 815-824.
- Munarin, F., Bozzini, S., Visai, L., Tanzi, M. C., Petrini, P. (2013). Sterilization Treatments on Polysaccharides: Effects and Side Effects on Pectin. *Food Hydrocolloids*, 31, 74-84.