

FORMULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA VIABILIDADE TÉCNICA DE HIDROGÉIS CONTENDO ADITIVOS APLICÁVEIS NA PRODUÇÃO DE CARNE CULTIVADA POR IMPRESSÃO 3D

Palavras-Chave: CARNE CULTIVADA, CORANTES NATURAIS, BIOIMPRESSÃO 3D

Autores(as):

LEONARDO LOURENÇO GOULART, FEQ - UNICAMP

ISABELA MARÇAL LIMA, FEQ – UNICAMP

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

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

Prof^(a). Dr^(a). ANGELA MARIA MORAES (orientadora), FEQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO

A carne cultivada, produzida a partir da multiplicação *in vitro* de células animais, é uma alternativa ética e promissora à produção de carne por pecuária tradicional, sendo capaz de minimizar o uso de recursos naturais, reduzir a geração de poluentes e proporcionar maior controle sanitário e nutricional (Lee et al., 2021; Santos et al., 2023).

Para o desenvolvimento de estruturas complexas, como bifes, a partir desse processo, é necessário o uso de estruturas tridimensionais denominadas *scaffolds*, que atuam como suportes temporários para adesão, multiplicação e diferenciação celular. Esses suportes podem ser produzidos por bioimpressão 3D, que permite a deposição precisa de biotintas em geometrias controladas (Seah et al., 2022). Dentre os materiais usados na produção das biotintas, destacam-se a xantana (X), o alginato (A) e a gelatina (G), por suas propriedades reológicas, biocompatibilidade e alta retenção hídrica (Bomkamp et al., 2022). Por também terem comportamento pseudoplástico e capacidade de formação de filamento, esses materiais são já aplicados em bioimpressão 3D (Petri, 2015; Malda et al., 2013).

Considerando a relevância da aparência visual para a aceitação comercial da carne cultivada, avaliou-se a incorporação de corantes naturais em hidrogéis à base de X, A e G, visando simular as tonalidades características da carne bovina, conforme mostrado por Ryu et al. (2023). Foram utilizados extrato de beterraba (EB, rico em betanina) e fibras de maçã (FM), para conferir coloração avermelhada, amarronzada ou amarelada, equivalentes à coloração de músculo ou gordura de um bife com diferentes níveis de cocção. O desempenho reológico, estrutural, a estabilidade e o aspecto final dos hidrogéis após a impressão 3D foram analisados.

METODOLOGIA

MATERIAIS

Os materiais utilizados nesta pesquisa foram alginato de sódio (código W201502, lote MKCC4541, Sigma-Aldrich), com massa molecular média de $64,8 \pm 16,6$ kDa e índice de polidispersividade de $1,32 \pm 0,17$, goma xantana (Xantural tipo 180, lote 2J7007K, CP Kelco), caracterizada por um teor de ácido pirúvico superior a 1,5% e massa molecular de aproximadamente 1000 kDa, gelatina tipo B derivada de pele bovina (código G9391, lote 5LCM2104, Sigma-Aldrich), tampão fosfato salino (PBS, código P4417, lote SLCN8514, Sigma-Aldrich), e cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, código C7902, lote SLCF1048, Sigma-Aldrich,).

PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Pigmentos naturais (extrato de beterraba ou fibra de maçã) foram solubilizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 6% (m/v), sob agitação magnética a 350 rpm por 20 min. As soluções foram filtradas a vácuo para garantir a separação das frações solúvel e insolúvel. Em seguida, soluções dos polissacarídeos A e X, a uma concentração de 5% (m/v), foram, separadamente, preparadas em PBS à temperatura ambiente, sob agitação (500 rpm, 20 min). As soluções foram misturadas nas proporções de X:A de 2:1 (v/v) em seringas de 20 mL. A solução de gelatina foi preparada em PBS a aproximadamente 40 °C, nas concentrações de 9% e 18% (m/v), e então incorporada à mistura A:X na proporção de 2:1 (v/v) entre a mistura dos polissacarídeos e a gelatina. A seguir, o hidrogel obtido foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min e centrifugado a 3000 rpm por 5 min. Após o preparo, as formulações foram armazenadas a 4 °C e utilizadas nos testes de caracterizações à temperatura ambiente. Foram preparadas as formulações AXG-3 e AXG-9, sendo a primeira preparada utilizando-se a solução de gelatina a 18%, e a segunda a 9% (m/v).

ANÁLISES QUALITATIVAS

Analisou-se a formação manual de filamentos pela extrusão dos hidrogéis por seringas de 5 mL acopladas a agulhas gauge 18, avaliando-se a continuidade e homogeneidade dos filamentos formados. As formulações também foram também extrudadas sobre uma plataforma vazada, com vãos de 1 a 6 mm, para se observar a sua estabilidade estrutural dos filamentos obtidos.

ANÁLISE DA REOLOGIA

As análises foram feitas em um reômetro modular Anton-Paar MCR-10, com geometria cone CP-50 e varredura de taxa de cisalhamento entre $0,1 \text{ s}^{-1}$ e 1000 s^{-1} , com duração de cerca de 10 min por replicata. A partir desta análise, foram determinados os índices de consistência (K) e comportamento de fluxo (n) empregando o modelo *power-law*. Para simular o processo de extrusão, foi aplicado o teste de tixotropia de três intervalos (3ITT), com avaliação da recuperação de viscosidade (Rv). Além disso, realizou-se uma varredura de frequência para quantificar os módulos elástico (G') e viscoso (G'') e o fator de perda ($\tan \delta = G''/G'$), para analisar o perfil viscoelástico das amostras.

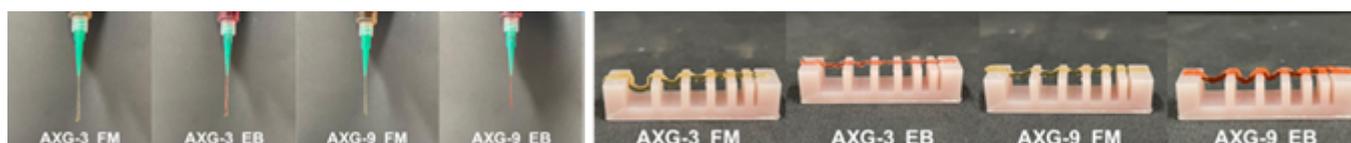
TESTE DE EXTRUSÃO

O teste de extrusão foi realizado em um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XTplus - Texture Analyser). As amostras foram extrudadas por bicos de extrusão de 18G e 22G (diâmetros internos nominais correspondendo a 0,838 mm e 0,414 mm, respectivamente), empregando 4mm/s, 8mm e 0,098N, para a velocidade, distância e força de disparo, respectivamente. As análises de força média foram realizadas na região linear do gráfico de força *versus* deslocamento (Baú, 2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises qualitativas realizadas, com resultados mostrados na Figura 1, demonstraram que todas as formulações formaram filamentos estáveis, contínuos e uniformes por extrusão manual, sem gotejamento, indicando boa resistência e adequado potencial para bioimpressão 3D. Os géis se mostraram translúcidos, com nuances de cor, dependendo da pigmentação. Em relação à gelatina, observou-se que formulações com menores concentrações mostraram-se mais fluidas. No entanto, ambas mantiveram bom desempenho em termos de deposição e continuidade do filamento.

Figura 1: Registros fotográficos dos testes qualitativos de formação de filamento (imagens à esquerda) e de resistência à deposição em molde vazado (imagens à direita).



Os resultados das análises reológicas estão sumarizados na Tabela 2. Todas as formulações apresentaram $n < 1$, caracterizando comportamento pseudoplástico, característica esta desejável para bioimpressão 3D, pois permite a redução da viscosidade sob cisalhamento e sua recuperação em repouso, favorecendo o escoamento pelo bico de extrusão e a manutenção da estrutura após a deposição. Todas as amostras também apresentaram $\tan \delta < 1$, indicando a predominância do módulo elástico (G') sobre o módulo viscoso (G''), o que confirma um comportamento viscoelástico sólido, que pode ser associado à maior capacidade de manutenção estrutural e fidelidade dimensional em aplicações de bioimpressão. Já a recuperação de viscosidade variou entre as formulações testadas. De modo geral, as formulações com menor concentração de gelatina (AXG-9) apresentaram maiores porcentagens de recuperação em comparação às suas correspondentes com maior teor de gelatina (AXG-3). Além disso, as amostras contendo FM apresentaram melhor desempenho que aquelas com EB, independentemente da concentração de G. Esses resultados sugerem que a menor concentração de G (formulação AXG-9) favoreceu a reconstrução da rede após o cisalhamento, possivelmente devido à menor rigidez da matriz, o que facilita a reorganização das cadeias após a deformação.

Quanto ao efeito dos pigmentos, supõe-se que a FM, por ser rica em polissacarídeos insolúveis com potencial gelificante, tenha contribuído para a coesão da estrutura. Em contraste, o EB, constituído majoritariamente por compostos fenólicos hidrossolúveis, pode ter interferido nas interações

intermoleculares da rede, prejudicando sua recomposição. Dentre as formulações testadas, AXG-9_FM apresentou o melhor desempenho em termos de recuperação estrutural após o cisalhamento, indicando maior capacidade de manter a integridade durante a extrusão e após a deposição. A partir desses resultados, considera-se a formulação AXG-9_FM como a mais promissora para bioimpressão, pois esta se destaca em termos de estabilidade, recuperação rápida de forma e fidelidade dimensional.

Tabela 2: Parâmetros reológicos das formulações de hidrogel: comportamento pseudoplástico, predominância elástica e recuperação da viscosidade.

Formulação	Índice de comportamento do escoamento	Razão G''/G'	Recuperação da viscosidade (%)
AXG-3_EB	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	62,0%
AXG-3_FM	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	81,5%
AXG-9_EB	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	83,8%
AXG-9_FM	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	98,0%

Os resultados dos testes mecânicos de extrusão são apresentados na Tabela 3. As formulações contendo FM demonstraram maiores forças de extrusão em comparação àquelas com EB, independentemente do diâmetro do bico de extrusão (agulha) utilizado. As amostras com maior concentração de G (AXG-3) exigiram maior força de extrusão do que as formulações com menor concentração (AXG-9), o que indica que a gelatina contribui para o aumento de rigidez do gel. Formulações contendo o EB apresentaram forças de extrusão mais baixas, muito provavelmente pela sua menor interação estrutural com a matriz polimérica, como mencionado anteriormente. Além disso, a variação no diâmetro da agulha influenciou os resultados conforme esperado: a redução do diâmetro da agulha de 18G para 22G resultou em aumento da força de extrusão em todas as formulações, devido à maior resistência ao fluxo em canais mais estreitos.

Tabela 3: Força de extrusão (N) requerida pelas formulações AXG-3 e AXG-9 contendo pigmentos naturais (EB ou FM), determinada com agulhas 18G e 22G.

Formulação	Força de extrusão (N)	
	18G	22G
AXG-3_EB	$9,9 \pm 0,3$	$27,7 \pm 0,3$
AXG-3_FM	$15,2 \pm 0,1$	$52,2 \pm 0,5$
AXG-9_EB	$14,3 \pm 0,3$	$30,5 \pm 1,4$
AXG-9_FM	$9,5 \pm 0,5$	$33,5 \pm 0,5$

CONCLUSÕES

As formulações de hidrogel desenvolvidas demonstram comportamento reológico adequado para aplicações em bioimpressão 3D, com perfil pseudoplástico ($n < 1$), predominância das propriedades elásticas ($\tan \delta < 1$) e boas capacidades de recuperação de viscosidade após o cisalhamento. A concentração de gelatina e o tipo de pigmento natural utilizados influenciaram de maneira significativa o desempenho das formulações. Foi observada uma melhor recuperação estrutural nas amostras com menor teor em G e com adição de FM. A formulação AXG-9_FM apresentou o melhor desempenho, reunindo características como força de extrusão adequada, alta recuperação da viscosidade e propriedades viscoelásticas favoráveis. Considera-se, portanto, que essa formulação é a mais promissora para aplicações em bioimpressão de *scaffolds* para o desenvolvimento de carne cultivada com boa fidelidade estrutural e dimensional.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos a colaboração do doutorando Victor Marchiori de Souza na realização e análise dos testes mecânicos, e pelo suporte técnico nas análises laboratoriais. Agradecemos também ao doutorando Rodolpho Fagundes Correa pelo auxílio na execução dos testes mecânicos e suporte no processo de esterilização das amostras. Também agradecemos a colaboração da doutoranda Ingri Julieth Mancilla Corzo, orientada do Prof. Marcos A. D'Ávila (FEM/UNICAMP), pelo apoio na realização e análise dos ensaios reológicos. Agradecemos, por fim, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica (PIBIT) pelo apoio financeiro e pela oportunidade da realização do projeto.

BIBLIOGRAFIA

- Baú, R. Z. Influência do ácido hialurônico e alginato de sódio na reologia e na liberação da sinvastatina em hidrogéis termossensíveis à base de Pluronic F127. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2023
- Bomkamp, C. et al. (2022). Scaffolding biomaterials for 3D cultivated meat: Prospects and challenges. *Advancement of Science*, 9(3):e2102908.
- Lee, K.-Y. et al. (2021). Systems for muscle cell differentiation: from bioengineering to future food. *Micromachines*, 13(1):71.
- Malda, J. et al. (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, 25(36):5011–5028.
- Petri, D. F. S. (2015). Xanthan gum: a versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23):42035
- Ryu, K. K. et al. (2023). Applications of various natural pigments to a plant-based meat analog, *LWT - Food Science and Technology*, 174:114431.
- Santos, A. C. A et al. (2023). Tissue engineering challenges for cultivated meat to meet the real demand of a global market. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7):6033.
- Seah, J. S. H. et al. (2022). Scaffolds for the manufacture of cultured meat. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(2):311–323.