

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO PROTEÍNA VEGETAL PARA APLICAÇÃO NA BIOIMPRESSÃO 3D DE CARNE CULTIVADA

Palavras-Chave: BIOIMPRESSÃO 3D, HIDROGEL, CARNE CULTIVADA

Autores(as):

ISABELA MARÇAL LIMA, FEQ – UNICAMP

LEONARDO LOURENÇO GOULART, FEQ – UNICAMP

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

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

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

INTRODUÇÃO:

Diante do aumento da demanda global por alimentos e dos impactos ambientais associados à pecuária tradicional, a carne cultivada surge como uma alternativa promissora, mais ética e sustentável. Dentre as tecnologias emergentes, a bioimpressão 3D permite a produção de estruturas cárneas mais complexas, como bifês e filês, a partir de células obtidas por biópsia, expandidas *in vitro* e organizadas sobre suportes (*scaffolds*) específicos (Lee et al., 2021; Santos et al., 2023). Os *scaffolds*, além de favorecer a adesão e proliferação celular, devem apresentar propriedades adequadas para a bioimpressão, como pseudoplasticidade, coesão do filamento e estabilidade estrutural (Lee et al., 2021; Seah et al., 2022).

Hidrogéis constituídos de polímeros naturais mostram-se adequados para a produção de *scaffolds*, devido à sua biocompatibilidade e propriedades físico-químicas (Singh et al., 2023). Dentre os principais compostos utilizados para este fim, o alginato (A), a goma xantana (X) e extratos protéicos de plantas como amaranto (Am), soja (S) e ervilha (E) são particularmente atraentes. O alginato apresenta capacidade de reticulação na presença de íons bivalentes (Lee et al., 2020), a goma xantana (X) possui comportamento pseudoplástico em solução (Petri, 2015) e os extratos mencionados são capazes de promover a adesão celular (Ayala-Niño et al., 2020; Kim et al., 2024).

Diante desse contexto, o presente trabalho visou a obtenção de hidrogéis de alginato e goma xantana, combinados com extratos de proteínas vegetais - Am, S e E - com características adequadas para a bioimpressão 3D. O desempenho das formulações foi analisado por meio de testes qualitativos, análises reológicas e ensaios de printabilidade.

METODOLOGIA:

MATERIAIS:

Para a realização deste trabalho foram utilizados A (W201502, Sigma-Aldrich, lote MKCC4541) de massa molecular média de $64,8 \pm 16,6$ kDa e índice de polidispersividade de $1,32 \pm 0,17$, X (CPKelco, Xantural 180, 2J7007K), farinha de Am disponível comercialmente (Vitalin, lote 00214/24 18:38), proteínas de E (NTC-PRO300, lote 240205/1) e S (NTRMIX-PRÓ70, lote 240205/2) da Nutrassim, solução salina tamponada com fosfato (PBS, Invitrogen, lote 79032721), cloreto de cálcio dihidratado (Synth, lote 104655), hidróxido de sódio (Ecibra, lote 17.803) e ácido clorídrico (LSChemicals, lote 25.669).

ISOLAMENTO DA PROTEÍNA DO AMARANTO:

Farinha de Am previamente triturada e peneirada (*mesh* 32) foi adicionada a água deionizada na proporção 1:10 m/v. O pH da solução foi ajustado para 9 com solução de NaOH 2M, e a mistura foi mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a alta rotação por 20 min a 15°C. O pH do sobrenadante foi ajustado para 5 com solução aquosa de HCl a 2M para promover a precipitação da fração albumina. Após nova centrifugação, o precipitado foi coletado, teve seu pH ajustado para 7 e foi liofilizado sob vácuo à temperatura ambiente por 48 h.

PREPARO DAS FORMULAÇÕES:

Soluções de A (8% m/v) e X (4% m/v) foram preparadas em PBS sob agitação mecânica vigorosa à temperatura ambiente. Em seguida, foram misturadas com soluções dos extratos de Am, S e E (também em PBS) na proporção de 3:1 (v/v). através de seringas interconectadas, originando formulações com menor (AXAm-3, AXS-1 e AXE-1) e maior (AXAm-4, AXS-2 e AXE-2) proporção de goma xantana. Os extratos proteicos de S e E foram previamente submetidos a 92°C por 1 hora e acrescidos de goma xantana a 0,3% m/v, com base no trabalho de Liu et al. (2023). As formulações foram esterilizadas por autoclavagem (121°C, 15 min), centrifugadas e armazenadas a 4°C até o uso.

ANÁLISE QUALITATIVA:

Foi analisada a qualidade do filamento formado pela extrusão dos hidrogéis através de seringa de 20 mL acoplada a um bico de 18G, avaliando-se a uniformidade, continuidade e grau de espalhamento do filamento. Também foi realizado o teste de reticulação, pela exposição por 20 min dos hidrogéis depositados em placa de 24 poços à solução de CaCl₂ a 100 mM.

ANÁLISE REOLÓGICA:

Foi analisada a variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento no intervalo de $0,1 \text{ s}^{-1}$ a 1000 s^{-1} , empregando-se para o ajuste dos dados o modelo de potência (Equação 1) (Morrison, 2001). Fez-se também a análise de varredura de frequência, para se obter a razão entre os módulos viscoso e elástico ($\tan \delta = G''/G'$) e o comportamento viscoelástico do hidrogel e avaliou-se a tixotropia com 3 intervalos (3ITT) para quantificar a recuperação da viscosidade após aplicação de cisalhamento de 1 s^{-1} e 100 s^{-1} (Equação 2):

$$\mu = m\dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{Equação 1})$$

$$Rv = \frac{v_f}{v_i} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

em que μ [Pa*s] é a viscosidade, m [Pa*sⁿ] é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ [s⁻¹] é a taxa de cisalhamento, n [-] é o índice de comportamento; e v_f e v_i [Pa*s] são a viscosidade final e inicial. Para materiais pseudoplásticos, $n < 1$.

ANÁLISE DE PRINTABILIDADE:

Após a análise dos resultados dos testes anteriores, foi selecionada a formulação mais promissora contendo cada proteína vegetal para realizar o teste de printabilidade. As impressões foram realizadas em biopressora TissueStart™ (TissueLabs), com bico de 18G acoplado à seringa. Foram ajustados os parâmetros de *flow* (fluxo de extrusão) e velocidade de impressão, visando a formação de construtos estáveis e reproduzíveis. Foram calculados a printabilidade, que representa a fidelidade do construto impresso em relação ao modelo teórico da Figura 1, conforme Equação 3, e o espalhamento do filamento, segundo a Equação 4:

$$Pr = \frac{L^2}{16A_c} \quad (\text{Equação 3})$$

$$F_s = \frac{F_{w,r} - F_{w,t}}{F_{w,t}} * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

em que Pr é a printabilidade, L [m] é o perímetro do poro e A_c [m²] é a área do poro; F_s é o espalhamento do filamento, e $F_{w,r}$ e $F_{w,t}$ [m] são as espessura real e teórica do filamento.

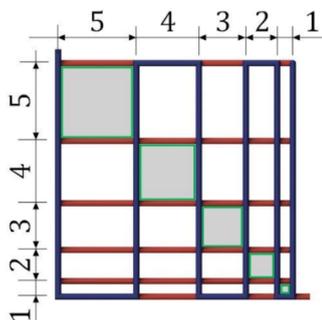


Figura 1. Modelo utilizado para o teste de printabilidade (Azoubel, 2022).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Todas as formulações formaram filamentos contínuos e uniformes. No entanto, a formulação AXAm-4, que tem maior proporção de goma xantana, apresentou comportamento excessivamente elástico (o filamento se estendia em excesso sem se romper facilmente, resultando em fios que se alongavam e dificultavam o controle da extrusão). Esse efeito compromete a precisão do processo de bioimpressão e pode causar falhas na deposição dos filamentos.

As formulações contendo extratos de soja e de amaranto apresentaram partículas insolúveis visíveis na formulação final, o que pode interferir negativamente no processo de impressão, ao prejudicar a capacidade de extrusão do gel e a resolução dos construtos impressos.

No teste de reticulação, todas as formulações formaram discos resistentes ao manuseio após 20 min de exposição à solução reticulante, indicando uma gelificação eficiente nessas condições.

Os resultados obtidos na análise reológica estão indicados na Tabela 1. Todas as formulações apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), o que é desejável em processos de bioimpressão, pois permite que o material escoie com facilidade pelo bico de extrusão e recupere sua estrutura após a deposição. No teste de tixotropia, as formulações AXS-2, AXE-1 e AXE-2 apresentaram maior recuperação de viscosidade, comportamento considerado favorável para bioimpressão 3D, pois indica que o material tende a recuperar sua estrutura após o cisalhamento imposto durante a extrusão. Além disso, os resultados da varredura de frequência indicaram $\tan \delta < 1$ para todas as formulações, evidenciando um comportamento predominantemente elástico.

Tabela 1. Resultados dos testes de reologia.

Formulação	Teste de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento	Teste de varredura de frequência	Faixa de dados do teste de tixotropia de 3 intervalos
AXAm-3	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	R_v : 82 a 87%
AXAm- 4	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	R_v : 59 a 73%
AXE-1	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	R_v : 94 a 97%
AXE-2	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	R_v : 85 a 95%
AXS-1	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	R_v : 77 a 79%
AXS-2	$n < 1$	$\tan \delta < 1$	R_v : 97 a 99%

Dessa forma, tomando como base os resultados dos testes qualitativos e de reologia selecionou-se as formulações AXAm-3, AXE-1 e AXS-2 para análise de desempenho na impressão, cujos resultados são apresentados na Figura 2. Os dados de printabilidade indicam a formação de poros com bordas irregulares (Soltan et al., 2019). Quanto ao espalhamento de filamento, as formulações AXAm-3 e AXE-1 apresentaram maior espalhabilidade, o que pode comprometer a definição dos construtos impressos.

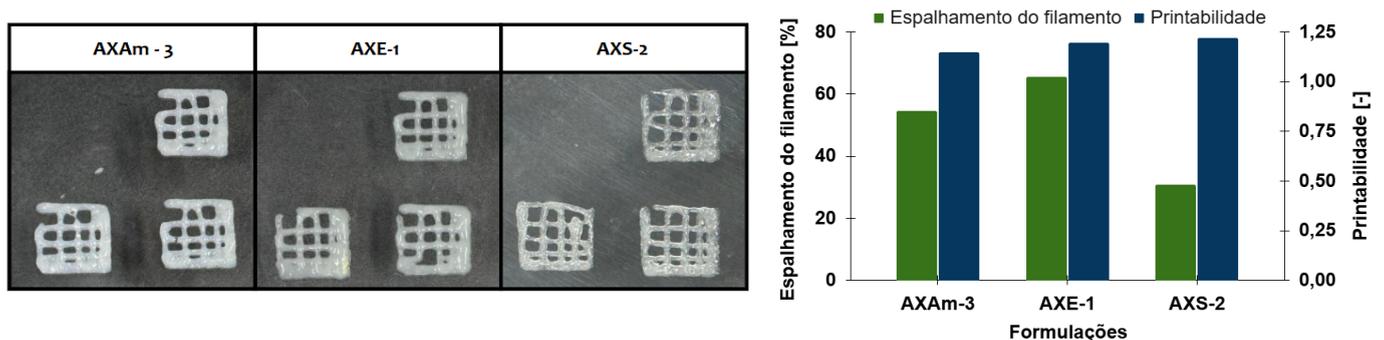


Figura 2. Resultados do teste de printabilidade. À esquerda, imagens das estruturas impressas. À direita, espalhamento e printabilidade das diferentes formulações.

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados, conclui-se que as formulações AXAm-3, AXS-2 e AXE-1 são as mais indicadas para a finalidade proposta apresentando melhores resultados nos testes de reologia, especialmente no teste de tixotropia em que apresentaram as melhores recuperações de viscosidade.

Mas, ainda é recomendável o aprimoramento dessas formulações para diminuir o espalhamento do material observado durante o processo de impressão. Também foi possível concluir que o aumento da proporção de goma xantana na formulação contendo extrato de amarantho com o intuito de se aumentar a sustentação do filamento não se mostrou como alternativa viável, por resultar em um hidrogel com características elásticas inadequadas para a impressão 3D.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao doutorando Victor Marchiori de Souza e ao doutorando Rodolpho Fagundes Correa pelo auxílio na esterilização dos hidrogéis e pelo constante suporte nas práticas laboratoriais, à doutoranda Bárbara Flaibam, orientada pela Profa. Dra. Rosana Goldbeck (FEA/UNICAMP), e à mestranda Isabelle Vasconcelos pela liofilização das amostras de extrato proteico de amarantho e à doutoranda Ingri Julieth Mancilla Corzo, orientada do Prof. Marcos A. D'Ávila (FEM/UNICAMP), pelo auxílio na realização e análise dos testes de reologia. Por fim, agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo financiamento e oportunidade de realização do projeto.

BIBLIOGRAFIA

- Ayala-Niño, A. et al. (2020). Amaranth proteins as a source of bioactive peptides: a review. *International Food Research Journal*, 27(1):1-15.
- Azoubel, R. A. Reologia e manufatura aditiva de hidrogéis nanocompósitos combinando pectina e nanocristais de celulose. Dissertação de Mestrado, FEM/UNICAMP, 2022.
- Kim, D. H. et al. (2024). Comparison of soy and pea protein for cultured meat scaffolds: evaluating gelation, physical properties, and cell adhesion. *Food Science of Animal Resources*, 44(5):1108–1125.
- Lee, K.-Y. et al. (2021). Systems for muscle cell differentiation: from bioengineering to future food. *Micromachines*, 13(1):71.
- Petri, D. F. S. (2015). Xanthan gum: a versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23):42035.
- Singh, A. et al. (2023). Recent advances in bioengineered scaffold for in vitro meat production. *Cell and Tissue Research*, 391(2):235–247.
- Liu, Z. et al. (2023). Pea protein-xanthan gum interaction driving the development of 3D printed dysphagia diet. *Food hydrocolloids*, 139:108497–108497.
- Morrison, F. A. *Understanding Rheology*. 1. ed. New York: Oxford University Press, Inc., 2001. v. 11.
- 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.
- Soltan, N. et al. (2019). Printability and cell viability in bioprinting alginate dialdehyde-gelatin scaffolds. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 10; 5(6):2976-2987.