



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO DA UFSC  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Gabrielle Antunes Seibert

**Carne Cultivada: Tendências na Utilização de *Scaffolds* Vegetais para Estruturação**

Florianópolis  
2023

Gabrielle Antunes Seibert

**Carne Cultivada: Tendências na Utilização de *Scaffolds* Vegetais para Estruturação**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador(a): Prof.(a) Silvani Verruck

Florianópolis

2023

Seibert, Gabrielle Antunes  
Carne Cultivada: Tendências na Utilização de Scaffolds  
Vegetais para Estruturação /Gabrielle Antunes Seibert ;  
orientadora, Silvani Verruck, 2023.  
79 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade  
Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em  
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Carne cultivada. 3. Scaffolds.  
I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

Gabrielle Antunes Seibert

## **Carne Cultivada: Tendências na Utilização de *Scaffolds* Vegetais para Estruturação**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 08 de dezembro de 2023.

Insira neste espaço  
a assinatura

Coordenação do Curso

### **Banca examinadora**

Insira neste espaço  
a assinatura

Prof.(a) Dr.(a) Silvani Verruck

Orientador(a)

Insira neste espaço  
a assinatura

Dr.(a) Ana Paula Almeida Bastos

Embrapa

Insira neste espaço  
a assinatura

Dr.(a) Vivian Feddern

Embrapa

Florianópolis, 2023.

Dedico esse trabalho de conclusão de curso aos meus pais, Carmen e Rogério, por sempre me apoiarem e me proporcionarem as melhores oportunidades do mundo.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão à todas as pessoas que tornaram possível a elaboração deste Trabalho de Conclusão de Curso. Primeiramente, quero agradecer a minha orientadora, Silvani Verruck, pela atenção e cuidados, por estar sempre disponível e por tirar dúvidas e orientar até mesmo durante os feriados e finais de semana. Você é um exemplo a ser seguido prof.(a), e inspiro a minha trajetória acadêmica na sua.

Agradeço também aos professores do EQA, pela transmissão de conhecimento e pela inspiração que proporcionaram ao longo do meu percurso acadêmico. Cada aula foi uma oportunidade de aprendizado, e sou grata por ter tido a chance de absorver tanto conhecimento valioso. Aos meus amigos e familiares também deixo o meu muito obrigado. Vocês estiveram presentes em todas as etapas da minha vida, e nessa não poderia ser diferente. Agradeço por terem compreendido os momentos de ausência e por terem sido calma e tranquilidade durante este período tão intenso.

Um agradecimento especial ao Gabriel, por toda a paciência e acolhimento. Você foi meu porto seguro, me mostrou que a vida acontece nos pequenos momentos e que não preciso ter tanta pressa para conquistar o mundo. À UFSC, meu agradecimento especial por ter me acolhido como aluna e ter me ensinado tanto sobre conexões, carreira e profissionalismo. Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista. Este trabalho não seria possível sem a colaboração e apoio de cada um de vocês.

## RESUMO

A população mundial está alcançando a marca de oito bilhões de pessoas, número que cresce a cada dia, aumentando exponencialmente a demanda por alimentos. Para que a produção de carne acompanhe a demanda futura, são necessárias transformações nos sistemas alimentares. A carne cultivada surge como uma fonte alternativa de proteína que pode atender à demanda futura. Para criar um tecido muscular estruturado, as células são geralmente cultivadas em uma estrutura 3D comestível (*scaffold*), que suporta estrutural e biologicamente sua montagem. Os *scaffolds* visam se assemelhar às propriedades estruturais e bioquímicas da matriz extracelular (ME) que suporta a estrutura e a função das células em tecidos naturais. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão bibliográfica sobre *scaffolds* de origem polimérica ou vegetal usados para estruturação de carne cultivada. A escolha de um *scaffold* apropriado depende das propriedades do material, considerando a taxa de fixação, custo e perfil de degradação. Os materiais mais utilizados são: polímeros sintéticos, peptídeos de automontagem, moléculas da matriz extracelular e materiais derivados de plantas e fungos. O uso dos polímeros sintéticos se dá devido a possibilidade de ajustes precisos nas suas propriedades físicas e químicas, porém, muitos deles não são comestíveis e têm taxas de degradação lentas, gerando uma etapa custosa de dissociação. Peptídeos de automontagem se organizam em estruturas tridimensionais complexas que simulam a ME, mas tem um alto custo de fabricação. As moléculas da matriz extracelular conseguem simular a complexidade da ME a partir de uma ou mais das principais proteínas estruturais, desenvolvendo fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas para estimular o comportamento celular normal, garantindo a biocompatibilidade dos *scaffolds*. Materiais derivados de plantas e fungos, por possuírem estruturas naturais, podem reduzir a complexidade do processo de fabricação e aumentar a eficiência da produção de carne cultivada. Vários materiais podem ser combinados a fim de obter as vantagens de cada um. Os tipos de *scaffold* possíveis de se atingir são os fibrosos, porosos, micro carreadores e hidrogéis, e as técnicas de estruturação que podem ser empregadas envolvem bioimpressão 3D, micro fluídica, liofilização, cultura dinâmica, eletrofiação, e também a partir de abordagens livres de *scaffolds*. A bioimpressão 3D produz hidrogéis camada por camada, permitindo a criação de uma estrutura estável para processamento posterior. A micro fluídica e as culturas dinâmicas produzem micro carreadores, sendo a vantagem da micro fluídica a obtenção de fluxo laminar, fenômeno impossível de alcançar em dispositivos de grande escala, e a das culturas dinâmicas a criação de um ambiente controlado em um biorreator. A liofilização produz *scaffolds* porosos, que estrutura similar a uma esponja, fornecendo a estabilidade mecânica necessária para que as células cultivadas formem tecidos. A eletrofiação é uma técnica que produz *scaffolds* fibrosos. É um método simples, barato e já utilizado em diversos ramos industriais. Embora seja versátil e com potencial para produção em larga escala, sua aplicação em sistemas alimentares ainda não é muito pesquisada. De modo geral, este estudo destaca a diversidade de materiais e técnicas já utilizadas e possíveis aplicações futuras para a produção de *scaffolds* de origem vegetal para carne cultivada.

**Palavras-chave:** *scaffold*; carne cultivada; agricultura celular; biomateriais; bioimpressão 3D

## ABSTRACT

The world population is reaching the mark of eight billion people, a number that grows every day, exponentially increasing the demand for food. For meat production to keep up with future demand, transformations in food systems are necessary. Cultured meat emerges as an alternative source of protein that can meet future demand. To create structured muscle tissue, cells are usually grown on an edible 3D structure (*scaffold*), which structurally and biologically supports their assembly. *Scaffolds* aim to resemble the structural and, to some extent, biochemical properties of the extracellular matrix (EM) that supports the structure and function of cells in natural tissues. The objective of this work was to review the literature on *scaffolds* of polymeric or vegetable origin used for structuring cultivated meat. The choice of an appropriate scaffold depends on the properties of the material, considering the fixation rate, cost and degradation profile. The most used materials are: synthetic polymers, self-assembly peptides, extracellular matrix molecules and materials derived from plants and fungi. The use of synthetic polymers is due to the possibility of precise adjustments in their physical and chemical properties, however, many of them are not edible and have slow degradation rates, generating a costly step of dissociation. Self-assembly peptides are organized into complex three-dimensional structures that simulate EM, but have a high manufacturing cost. Extracellular matrix molecules can simulate the complexity of EM from one or more of the main structural proteins, developing growth factors, transcription factors and cytokines to stimulate normal cell behavior, ensuring the biocompatibility of *scaffolds*. Materials derived from plants and fungi, because they have natural structures, can reduce the complexity of the manufacturing process and increase the efficiency of cultivated meat production. Various materials can be combined in order to get the advantages of each. The types of *scaffolds* that can be achieved are fibrous, porous, micro carriers and hydrogels, and the structuring techniques that can be employed involve 3D bioprinting, microfluidics, freeze-drying, dynamic culture, electrospinning, and even scaffold-free approaches. 3D bioprinting produces hydrogels layer by layer, allowing the creation of a stable structure for further processing. The microfluidics and dynamic cultures produce micro carriers, being the advantage of microfluidics to obtain laminar flow, a phenomenon impossible to achieve in large-scale devices, and the dynamic cultures to create a controlled environment in a bioreactor. Lyophilization produces porous *scaffolds*, which structure is similar to a sponge, providing the mechanical stability necessary for cultured cells to form tissues. Electrospinning is a technique that produces fibrous *scaffolds*. It is a simple method, inexpensive and already used in several industrial branches. Although it is versatile and with potential for large-scale production, its application in food systems is not yet much researched. In general, this study highlights the diversity of materials and techniques already used and possible future applications for the production of *scaffolds* for cultivated meat.

**Keywords:** *scaffold*; cultured meat; cell agriculture; biomaterials; 3D bioprinting

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos de produção de carne cultivada	18
Figura 2 – Métodos de produção de <i>scaffolds</i>	42
Figura 3 – Métodos de bioimpressão 3D para <i>scaffolds</i>	43
Figura 4 – Protocolos de liofilização utilizados para produção de <i>scaffolds</i>	49
Figura 5 - Sistema de biorreator de leito fluidizado	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGA	Agarose
ALG	Alginato
ATMP	Aminoácido trimetileno ácido fosfônico
BME	$\beta$ -mercaptoetanol
BMSCs	Células-tronco mesenquimais da medula óssea nucleada
CA	Acetato de celulose
CB	Celulose bacteriana
CC	Carne Cultivada
DMF	Dimetilformamida
DSMO	Dimetil sulfóxido
EBB	Bioimpressão baseada na extrusão
FDA	Food and Drug Administration
GelMA	Gelatina metacrilóil
GG	Goma ghatti
GGE	Gases de efeito estufa
HAP	Hidroxiapatita
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
HiPSCs	Células-tronco pluripotentes induzidas humanas
HUVEC	Células endoteliais de veias humanas imortalizadas
IPSCs	Células tronco pluripotentes induzidas
KER	Proteínas do cabelo humano
KMG	Glucomanano de konjac
LAB	Bioimpressão assistida por laser
MC	Metil celulose
ME	Matriz extracelular
MS	Meio Murashige e Skoog
NMP	Polimerização mediada por nitroxido
OAT	Extrato etanólico de Avena sativa
PAni	Polianilina
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietileno glicol

PGS	Poli (glicerol sebacato)
PHB	Poli-3-hidroxibutirato
PLA	Poliácido láctico
PLCL	Poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone)
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
PMDS	Polidimetilsiloxano
PMEDSAH	Poli(2(metacrilóiloxi) etil dimetil-(3-sulfopropil) hidróxido de amônio)
PMVE-alt-MA	Poli(metil vinil éter-alt-anidrido maleico)
PU	Poliuretano
PVA	Acetato de polivinila
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
RGD	Ácido arginilglicilaspártico
SPH	Hidrolisado de proteína de soja
STMP	Trimetafosfato de sódio
TMPGE	Éter trimetilpropano triglicídico reticulador
UV	Ultra-violeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>14</b>
<b>3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CARNE CULTIVADA</b>	<b>15</b>
3.1 ESTRUTURA DO TECIDO MUSCULAR	15
3.2 ETAPAS PARA PRODUÇÃO DE CARNE CULTIVADA	17
<b>4 MATÉRIAS-PRIMAS PARA <i>SCAFFOLDS</i> DE ORIGEM NÃO ANIMAL</b>	<b>18</b>
<b>5 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i></b>	<b>41</b>
5.1 BIOIMPRESSÃO 3D	42
5.2 MICRO FLUÍDICA	46
5.3 LIOFILIZAÇÃO	47
5.4 CULTURAS DINÂMICAS	50
5.5 ELETROFIAÇÃO	54
5.6 ABORDAGENS LIVRES DE <i>SCAFFOLDS</i>	57
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial está alcançando a marca de oito bilhões de pessoas, e crescendo mais a cada dia. Estimativas mostram que até 2050 esse número chegará a um total entre 9 e 11 bilhões, causando também um aumento exponencial na demanda por alimentos (Röös *et al.*, 2017). Sabe-se que o consumo de carne, obtida convencionalmente a partir de animais de produção, é universalmente considerado parte fundamental da dieta humana. No entanto, a produção tradicional de carne impõe várias questões ambientais e de sustentabilidade, incluindo o esgotamento dos recursos de terra e água doce, emissão de gases de efeito estufa e conversão ineficiente de nutrientes (Bhat *et al.*, 2017).

Ainda conforme Bhat *et al.* (2017), infecções transmitidas por alimentos, doenças associadas à dieta, doenças infecciosas e resistência a antimicrobianos são apenas alguns dos problemas ligados ao setor da pecuária. Outras problemáticas da pecuária intensiva, que vem se desenvolvendo desde a década de oitenta, são crises de saúde pública, como a encefalopatia espongiforme bovina e a contaminação de produtos de criação de frangos, bovinos, suínos, leite e salmão com dioxinas e, mais recentemente, a gripe suína e gripe aviária (Bellet *et al.*, 2019).

Também pode-se destacar que a intensificação da produção agropecuária está envolvida na emissão de gases de efeito estufa (GEE), principalmente metano e óxido nitroso. Conforme relatado por Guerci *et al.* (2013) e Godfray *et al.* (2018), a agricultura contribui com 10-12% das emissões totais, enquanto a produção de gado, especialmente ruminantes, contribui com um total de 14,5%. Devido a emissão de GEE e a necessidade de crescimento do setor para alimentar a população cada vez maior, surgem as preocupações públicas com as mudanças climáticas. Essas, parecem direcionar o comportamento de compra dos consumidores, pelo menos até certo ponto, já que o aumento da cobertura da mídia sobre as mudanças climáticas está associado à diminuição da demanda por carne bovina (Godfray *et al.*, 2018). Apesar da maior conscientização sobre as mudanças climáticas, o consumo global de carne continua a aumentar de forma constante (FAO, 2022; Tonsor *et al.*, 2018), sugerindo que o desejo de evitar impactos climáticos não é, por si só, suficiente para reduzir significativamente o consumo de carne.

Para que a produção de carne acompanhe a demanda futura, são necessárias transformações, e não melhorias incrementais, nos sistemas alimentares e suas cadeias de suprimentos associadas (Stoll-Kleemann *et al.*, 2015). Sendo assim, a carne cultivada surge como uma fonte alternativa de proteína que pode atender à demanda futura, ao mesmo tempo em que aborda os desafios associados à pecuária tradicional (Stoll-Kleemann *et al.*, 2015). A

partir da carne cultivada busca-se alcançar características de produto que garantam atributos sensoriais e nutritivos iguais (ou melhores) aos produtos de carne convencionais (Stoll-Kleemann *et al.*, 2015). A carne cultivada representa a produção *in vitro* de carne sem o sacrifício de animais. Mais especificamente, ela é produzida a partir de células usando técnicas de engenharia de tecidos. A técnica requer o isolamento de algumas células de animais vivos por meio de biópsia, seguida de sua expansão em biorreatores para produzir uma massa celular substancial. Essa produção envolve principalmente a geração de tecido muscular esquelético. No entanto, muitas vezes inclui adipócitos para produção de gordura, fibroblastos e/ou condrócitos para geração de tecido conjuntivo e células endoteliais para fornecer vascularização (Djissalov *et al.*, 2021).

Apesar de já existirem empresas que produzem carne cultivada no mercado, muitos desafios precisam ser resolvidos, como os altos gastos de fabricação e a aceitação do consumidor (The Good Food Institute, 2022). Então, para criar uma construção de tecido semelhante a um músculo, ou seja, a carne cultivada estruturada, as células são geralmente cultivadas em um *scaffold*, que é uma espécie de “andaime”, comestível, que suporta estrutural e biologicamente sua montagem. Etapas adicionais de processamento podem ser aplicadas para melhor imitar o sabor, a textura e os valores nutricionais da carne convencional (Djissalov *et al.*, 2021). Além disso, para que esse campo atinja todo o seu potencial, desafios tecnológicos significativos precisam ser resolvidos, como estabelecimento de linhagens celulares padronizadas, otimização de meios de cultura, design de bioprocessamento e tecnologia de *scaffolds*. Principalmente, o estabelecimento de tecnologias de *scaffolds* que suportam o crescimento e a morfologia celular. Em geral, os *scaffolds* de suporte celular visam se assemelhar às propriedades estruturais e, até certo ponto, bioquímicas da matriz extracelular (ME) que suporta a estrutura e a função das células em tecidos naturais (Cai *et al.*, 2020). Consequentemente, várias tecnologias de *scaffolds*, incluindo eletrofiação, *eletro spray*, bioimpressão 3D e extrusão, foram propostas para fabricar estruturas 3D com características biológicas, estruturais e mecânicas adequadas. Para sua aplicação em carne cultivada, no entanto, os valores nutricionais dos *scaffolds* e sua segurança também devem ser levados em consideração (Cai *et al.*, 2020).

Até o momento, a produção de carne cultivada é um tópico muito debatido com opiniões conflitantes sobre sua real viabilidade e sustentabilidade. Por este motivo, esta revisão visa descrever os principais *scaffolds* que vêm sendo testados e utilizados, abordando as metodologias utilizadas para estruturação de carne cultivada.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo é fazer uma revisão bibliográfica usando as publicações dos últimos cinco anos sobre *scaffolds* de origem polimérica ou vegetal usados para estruturação de carne cultivada.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Descrever o processo e os elementos básicos para a produção de carne cultivada;
- b) Descrever os principais materiais de origem polimérica ou vegetal usados para produção de *scaffolds*;
- c) Descrever os métodos que vêm sendo utilizados para produção de *scaffolds* e suas limitações;
- d) Apontar os principais desafios na produção de *scaffolds* de origem não animal.

### 3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CARNE CULTIVADA

#### 3.1. ESTRUTURA DO TECIDO MUSCULAR

Para desenvolver aplicações com *scaffolds* para carne cultivada através da engenharia de tecidos musculares, é necessário conhecer a estrutura de tecido muscular natural. Os vertebrados possuem três classes de músculos, os do esqueleto, lisos e cardíacos. Para carne cultivada, é utilizado majoritariamente o tecido esquelético, visto que geralmente são tecidos bem conservados entre as espécies (Bomkamp *et al.*, 2021). Para discussão da fabricação da carne cultivada (CC), serão considerados tecidos musculares de espécies vertebradas, como mamíferos, aves e músculo de pescados. Outros estudos podem, ainda, abordar o uso de tecidos de camarão, lula e *foie gras* (Bomkamp *et al.*, 2021).

Sabe-se que a textura fibrosa da carne vem da sua estrutura hierárquica tecidual. A fibra muscular, também conhecida como miofibra ou célula muscular, é a unidade funcional principal. Ela possui tecido conjuntivo, que a envolve, gordura intramuscular, vasculatura e nervos. Essas fibras musculares são ordenadas em feixes, denominados fascículos (Listrat *et al.*, 2016). O tecido conjuntivo é dividido em três partes, o endomísio, perimísio e epimísio, e cada uma delas envolve, respectivamente, fibras musculares, fascículos e os músculos inteiros (Listrat *et al.*, 2016).

Ainda sobre a estrutura hierárquica dos tecidos e sua importância para a fabricação de CC, sabe-se que a vascularização não tem contribuição nas propriedades organolépticas da carne, apenas realiza o transporte de oxigênio, nutrientes e minerais, tornando necessário a replicação de maneira diferente na CC (Gholobova *et al.*, 2020; Levenberg *et al.*, 2005). A reprodução dos nervos da carne na CC tampouco é desejada no sentido sensorial, porém, eles podem contribuir para a maturação da fibra muscular (Das *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020).

Em se tratando das propriedades nutricionais da carne, seu alto valor de proteínas de alta qualidade, que contém todos os aminoácidos, além dos ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais também é desejado na carne cultivada. Para garantir as mesmas propriedades nutricionais, é fundamental que o tecido recriado seja composto em aproximadamente 90% de seu volume de músculo, e os outros 10% de gordura e tecido conjuntivo (Listrat *et al.*, 2016). A gordura intra-muscular é um dos fatores determinantes para a suculência e sabor da carne (Listrat *et al.*, 2016). As gorduras intra-musculares também contribuem para a maciez e são fontes de vitaminas lipofílicas A, D, K, E, e lipídios essenciais, como ômega 3 (Fish *et al.*, 2020). Elas são compostas de adipócitos, lipídios estruturais, fosfolipídios e lipídios intra-

celulares (Listrat *et al.*, 2016) e seu teor varia de acordo com diversos fatores, como espécie, tipo de músculo, raça e alimentação.

Fibras musculares maduras são muito longas quando comparadas com as demais células do corpo. Elas são multinucleadas, com até 100 núcleos (Lodish *et al.*, 2000) e ficam embaladas em miofibrilas, feixes de filamentos contráteis compostos por longas cadeias de actina e miosina. Os filamentos são divididos em unidades contráteis funcionais denominadas sarcômeros. A sobreposição de actina e miosina dentro das miofibrilas dá aos músculos a sua aparência estriada característica (Listrat *et al.*, 2016).

Essas fibras musculares ficam em um tecido conjuntivo denso, composto por moléculas da matriz extracelular. As distinções entre endomísio, perimísio e epimísio são baseadas em observações microscópicas, essas diferenças na composição molecular das três camadas sugere o seguinte: o endomísio, que envolve as fibras musculares, possui uma rede colágena mecanicamente mais forte quando comparada com o perimísio e epimísio. Bodiou *et al.*, 2020 estimaram que essa rigidez muscular está na faixa de 2–12 kPa, o que pode ser benéfico para a expansão celular, e que o aumento da rigidez tecidual poderia induzir a diferenciação (Bodiou *et al.*, 2020). Porém, o tecido não é homogêneo, e podem haver variações na sua rigidez, o que confere a textura e maciez finais do produto. A matriz extracelular tem efeitos profundos na qualidade da carne, relacionados com os seus efeitos biológicos no tecido vivo e até com alterações durante o *post-mortem*. Os componentes principais da matriz extracelular são o colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (Nishimura *et al.*, 2015).

O colágeno é uma proteína fundamental na estrutura do tecido muscular. Sua reticulação desempenha um papel significativo nas propriedades mecânicas, podendo variar de acordo com o tipo de músculo, espécie e idade (Listrat *et al.*, 2016). É importante ressaltar que músculos com maior teor de colágeno podem ser menos nutritivos, devido ao aumento da quantidade de glicina, um aminoácido não essencial (Listrat *et al.*, 2016), e à ausência do aminoácido essencial triptofano (Paul *et al.*, 2019). Em frangos e suínos, acredita-se que as diferenças nos níveis de colágeno não tenham grande impacto na qualidade sensorial dentro de uma faixa típica (Listrat *et al.*, 2016). Isso ocorre porque a maioria dos animais criados para consumo são abatidos quando ainda jovens, momento em que os níveis de reticulação de colágeno são baixos. Por outro lado, nos peixes, o colágeno muscular apresenta baixa estabilidade térmica, o que resulta em perda de estrutura durante o cozimento. Esse fenômeno é responsável pela textura escamosa da carne de peixe cozida, devido à fusão do colágeno. Para o cultivo de peixes, é necessário desenvolver *scaffolds* que possuam essa menor estabilidade térmica, seja por meio de uma

temperatura de fusão mais baixa ou pela promoção da secreção de colágenos adequados. Isso permitiria a degradação do suporte original, resultando na textura desejada do produto cozido.

Além do colágeno, os proteoglicanos e as glicoproteínas também desempenham um papel importante na matriz extracelular muscular. Essas macromoléculas são compostas por uma proteína ligada a um carboidrato, sendo que os proteoglicanos contêm glicosaminoglicanos hidratados, como heparan sulfato e sulfato de dermatan (Gillies *et al.*, 2011). Os proteoglicanos contribuem para a ligação entre a membrana basal e o colágeno no endomísio colagenoso, além de atuarem no sequestro de fatores de crescimento. No tecido muscular, os proteoglicanos mais comuns são aqueles que se ligam ao sulfato de dermatan e ao sulfato de condroitina, como a decorina e o biglicano (Gillies *et al.*, 2011). Já as glicoproteínas, como fibronectina, laminina e nidogênio, possuem oligossacarídeos e desempenham um papel na ligação entre a membrana celular das fibras musculares e a membrana basal. Elas se conectam diretamente às integrinas na superfície celular e ao colágeno IV na membrana basal, formando uma estrutura complexa e interligada na membrana basal (Gillies *et al.*, 2011).

### **3.2 ETAPAS PARA PRODUÇÃO DE CARNE CULTIVADA**

O processo de produção de carne cultivada pode ser dividido em quatro etapas (Choi *et al.*, 2020), conforme ilustrado na Figura 1. A primeira envolve a obtenção de células que possam se diferenciar em vários tipos, como por exemplo, células musculares (miócitos), células de gordura (adipócitos), fibroblastos, que são necessárias para compor a carne (Miramontes *et al.*, 2020). A segunda área concentra-se no desenvolvimento de meios de crescimento que permitam altas taxas de proliferação de células a partir de ingredientes seguros e de baixo custo para alimentos. A terceira área diz respeito ao desenvolvimento de *scaffolds* seguros para alimentos, que imitam a função da matriz extracelular (Bodiou *et al.*, 2020). Por fim, os biorreatores e bioprocessos devem ser projetados de forma a atender às restrições de custo, esterilidade, segurança do alimento e capacidade de manter condições apropriadas para o crescimento celular e maturação de tecidos a longo prazo (Listrat *et al.*, 2016).

Apesar de já ser possível cultivar células de mamíferos em biorreatores de tanque com agitação de até 20.000 L na indústria farmacêutica, ainda é necessário um avanço significativo nos projetos de biorreatores para suportar a produção em larga escala de tecidos estruturados (Ahmed *et al.*, 2019). Dependendo do produto final e do processo escolhido, podem ser necessárias etapas adicionais de processamento para transformar as células ou tecidos no

produto final, que podem ser semelhantes aos métodos usados na produção de carne convencional. Embora os detalhes do processo de produção possam variar entre empresas e produtos, a Figura 1 fornece uma visão geral de como alguns processos de produção em potencial podem parecer na prática (Bomkamp *et al.*, 2021).

Figura 1. Técnicas para produção de carne cultivada.



Fonte: Adaptado de Bomkamp *et al.* (2021).

A partir da Figura 1, pode-se perceber que a fase inicial (1) se baseia em isolar e caracterizar as células apropriadas da espécie de interesse e armazená-las. Em muitos casos, esta etapa abrange o desenvolvimento de uma linhagem celular estável e imortalizada (Miramontes *et al.*, 2020). Na fase dois, as células são expandidas para aumentar a biomassa total. O objetivo é produzir um grande número de duplicações de células, mantendo as células em um estado indiferenciado e, portanto, proliferativo. Neste exemplo, as células podem ser cultivadas em um biorreator com agitação ou em frascos giratórios (spinner flasks) e podem crescer em micro carreadores, como agregados ou como células individuais (O’Neil *et al.*, 2021). Na fase três, que é a maturação do tecido, as células são cultivadas sob condições que promovem a diferenciação e maturação das células, normalmente, mas nem sempre, em *scaffolds* (Bodiou *et al.*, 2020). A escolha do meio e do biorreator é crucial nas fases 2 e 3 e provavelmente diferem entre ambas (Allan *et al.*, 2019). Para determinados tipos de produtos, processamentos posteriores devem ser feitos a fim de transformar os tecidos construídos por

engenharia em um produto final. Por exemplo, *scaffolds* carregados com miofibras maduras podem ser combinados com micro carreadores comestíveis, nos quais os adipócitos foram diferenciados em uma fase 3, separada do processo original para formar um hambúrguer (Bomkamp *et al.*, 2021).

Como alternativa, vários tipos de células podem ser diferenciadas, em meios diferentes e antes de suas inserções nos *scaffolds*, para perfazer o produto final. Também podem ser usadas folhas sem *scaffolds*, nas quais as proteínas da matriz extracelular secretadas se tornam o próprio *scaffold*, conforme demonstrado por Shahin-Shamsabadi & Selvaganapathy (2020). Variações adicionais neste esquema geral podem combinar as fases 2 e 3 ou pode evitar a necessidade da fase 4, realizando a maturação dos tecidos em um *scaffold* maior que é processado diretamente da mesma maneira que a carne convencional (Bomkamp *et al.*, 2021).

#### **4. MATÉRIAS-PRIMAS PARA SCAFFOLDS DE ORIGEM NÃO ANIMAL**

A escolha de um *scaffold* apropriado para carne cultivada depende das propriedades do material, considerando a taxa de fixação, custo e perfil de degradação. Os materiais mais utilizados são polímeros sintéticos, peptídeos de automontagem, moléculas da matriz extracelular e materiais derivados de plantas e fungos. Vários materiais podem ser combinados para obtenção de um produto que contenha as vantagens de cada material (Bomkamp *et al.*, 2021). No presente trabalho, apenas matérias primas de origem não animal serão exploradas. Os estudos destacam principalmente as abordagens de fabricação de *scaffolds* usando o formato de micro carreadores, porosos, fibrosos, hidrogéis, e ainda, abordagens livres de *scaffolds*. A Tabela 1, traz alguns exemplos de *scaffolds* que vêm sendo produzidos utilizando diferentes abordagens e matérias primas.

Os polímeros sintéticos oferecem um vasto leque de características vantajosas para a engenharia de tecidos. A possibilidade de ajustes precisos nas suas propriedades físicas e químicas permite adaptá-los às necessidades específicas de cada aplicação (Nikolovski & Mooney, 2000). No entanto, é importante ressaltar que esses polímeros não são encontrados naturalmente na natureza, o que torna essencial a fabricação em laboratórios especializados. Embora tenham suas vantagens, muitos deles não são comestíveis e têm taxas de degradação lentas. Isso gera a necessidade de uma etapa custosa de dissociação das células dos *scaffolds* após a fase de proliferação celular. Essa etapa, embora aumente o custo de produção, é imprescindível para garantir que as células possam ser liberadas do *scaffold* e utilizadas para a

formação de tecidos funcionais. Apesar desse desafio, em alguns casos, as vantagens proporcionadas por certos polímeros sintéticos, como o poli(metil vinil éter-alt-anidrido maleico)(PMVE-alt-MA) e poli(2(metacrilóiloxi) etil dimetil-(3-sulfopropil) hidróxido de amônio) (PMEDSAH), conseguem superar os custos adicionais, tornando-os atrativos para aplicações específicas na agricultura celular (Bomkamp *et al.*, 2021). Além disso, polímeros como poliácido láctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e polietileno glicol (PEG) também podem ser considerados para aplicações em *scaffolds*, e estudos indicam que pode ser possível estabelecer *scaffolds* de degradação mais rápida para usar como estruturas incorporadas ao tecido em certas configurações, se os produtos de degradação não forem prejudiciais às células e não permanecerem na carne cultivada final. Esta hipótese requer uma análise mais aprofundada (Bomkamp *et al.*, 2021).

Outra abordagem promissora na agricultura celular envolve os peptídeos de automontagem. Esses peptídeos são estudados tanto como *scaffolds* para suporte estrutural quanto como materiais utilizados na bioimpressão 3D (Das & Gavel, 2020). A natureza altamente versátil dos peptídeos de automontagem permite que eles se auto-organizem em estruturas tridimensionais complexas, simulando a matriz extracelular. Essa propriedade tem um enorme potencial para criar *scaffolds* que mimetizam a estrutura e função dos tecidos humanos. Um importante avanço nessa área é o desenvolvimento de revestimentos peptídicos projetados para controlar a adesão e o desprendimento celular. Esses revestimentos combinam sequências peptídicas, como o ácido arginilglicilaspártico (RGD), que promove a adesão celular, com locais de clivagem, permitindo a liberação controlada das células e, conseqüentemente, a produção contínua de células (CellulaREvolution; Aisenbrey, & Murphy, 2020). Empresas inovadoras, como a CellulaREvolution, estão liderando essas pesquisas e impulsionando o uso desses peptídeos de automontagem em aplicações práticas. No entanto, é importante mencionar que os custos associados à fabricação desses peptídeos ainda representam um desafio significativo para sua adoção em larga escala. Nesse sentido, a otimização de técnicas atuais e o uso de organismos recombinantes podem se mostrar cruciais para tornar viável a utilização desses peptídeos em *scaffolds* para carne cultivada (Miotto *et al.*, 2017).

A imitação das propriedades da matriz extracelular (ME) é um dos principais objetivos no desenvolvimento de *scaffolds* eficazes. Propriedades como sua resistência mecânica e flexibilidade, seus efeitos no comportamento celular e sua composição de nutrientes. Essa complexidade da ME pode ser substituída por *scaffolds* mais simples contendo uma ou mais das principais proteínas estruturais, desenvolvendo fatores de crescimento, fatores de

transcrição e citocinas para estimular o comportamento celular normal e a secreção da ME (Nikolovski & Mooney, 2000). A substituição de proteínas derivadas de animais por proteínas produzidas por fermentação microbiana, cultivo molecular de plantas (Rad-Malekshahi *et al.*, 2014) ou sistemas livres de células (Tinafar *et al.*, 2019) têm se mostrado uma opção promissora. A matriz extracelular desempenha um papel essencial na função e estrutura dos tecidos e órgãos no corpo humano. Ao utilizar proteínas produzidas por esses métodos, é possível garantir a biocompatibilidade dos *scaffolds* e a integração eficiente das células com o *scaffold*, o que é crucial para o sucesso da agricultura celular. Os colágenos do tipo I, por exemplo, têm sido amplamente utilizados em diferentes formas de *scaffolds*, como micro carreadores (Hewitt *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014), porosos, (Kanematsu *et al.*, 2004), hidrogéis (Langelaan *et al.*, 2011; Hickey *et al.*, 2018) e impressos em 3D (Skylar-Scott *et al.*, 2019). Embora grande parte das pesquisas tenha focado no colágeno derivado de animais, colágenos livres de animais foram produzidos com sucesso em plantas, bactérias e leveduras, conforme demonstrado por Campuzano & Pelling, 2019. Outra abordagem de uso de bactérias foi também estudada na produção de colágeno (Mohammadinejad *et al.*, 2019). Foi utilizada uma proteína semelhante ao colágeno expressa por *Streptococcus pyogenes*, e os resultados obtidos mostraram boa compatibilidade. A utilização de colágenos bacterianos tem se mostrado especialmente vantajosa, pois esses colágenos não possuem a limitação da coexpressão com enzimas devido à hidroxiprolina, o que facilita sua produção e viabiliza sua utilização em larga escala (Campuzano & Pelling, 2019; Mohammadinejad *et al.*, 2019).

Em adicional, materiais derivados de plantas ou fungos também podem ser utilizados como matérias primas para produção de *scaffolds*. Plantas descelularizadas, por exemplo, têm a capacidade de fornecer estruturas naturais em 3D, o que facilita o transporte de oxigênio e nutrientes essenciais para o crescimento celular (Gershlak *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2021). A utilização dessas estruturas naturais como *scaffolds* pode reduzir a complexidade do processo de fabricação e aumentar a eficiência da produção de carne cultivada. Estudos investigaram o uso de espinafre para *scaffolds* com base na sua ampla disponibilidade, vascularização densa e pecíolo largo (caule que liga a folha ao caule) (Gershlak *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2021). Outro exemplo de vegetal que vêm sendo explorado é a maçã. Hickey *et al.* (2018) demonstraram que maçãs descelularizadas podem apoiar a fixação e sobrevivência de mioblastos C2C12 durante um período de cultura de duas semanas, além de promover ligação e proliferação de células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e diferenciação em tecido ósseo (Peng *et al.*, 2010).

Essas características tornam as plantas uma alternativa atrativa e sustentável para a fabricação de *scaffolds*.

Além das plantas, algumas espécies de bactérias e algas também emergem como alternativas promissoras para o desenvolvimento de *scaffolds*. Essas matérias primas naturais possuem capacidade de produzir celulose, um componente chave na criação de *scaffolds* (Lai *et al.*, 2015). Estruturas baseadas em celulose bacteriana têm sido amplamente avaliadas para aplicações biomédicas de engenharia de tecidos, revelando-se como *scaffolds* potenciais para a criação de carne cultivada (Lai *et al.*, 2015). No entanto, ao utilizar *scaffolds* à base de celulose, seja proveniente de plantas descelularizadas ou outras fontes, é crucial considerar os efeitos nas propriedades organolépticas e nutricionais do produto final, uma vez que a celulose não é degradada pelo corpo humano (Lai *et al.*, 2015). Testes conduzidos por Lai *et al.* (2015) em ratos, implantando *scaffolds* contendo celulose bacteriana, indicaram uma degradação mínima em um período de 16 semanas. Isso sugere que a degradação completa dos *scaffolds* de celulose é improvável, mesmo durante uma longa fase de diferenciação. Por outro lado, derivados de fungos, como certas frações polissacarídicas encontradas em *Grifola frondosa*, têm mostrado efeitos benéficos além de seu papel como estruturas de suporte. Estudos têm revelado que essas frações estimulam tanto a proliferação quanto a síntese de colágeno em células fibroblásticas, tornando-os uma opção promissora para a criação de *scaffolds* inovadores e eficazes para a agricultura celular (Lee *et al.*, 2019).

Outro exemplo de uso de celulose bacteriana é o estudo conduzido por Recouvreux *et al.*, (2011). Os pesquisadores avaliariam a síntese, caracterização e aplicações potenciais de hidrogéis de celulose bacteriana (CB). Os hidrogéis foram sintetizados a partir de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) usando um método de cultura estática modificado, o que lhes permitiu obter grandes estruturas tridimensionais, maiores que 150 cm<sup>3</sup>, semelhantes a órgãos. As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram determinadas e comparadas com outros tecidos moles como rim e fígado de boi. A biocompatibilidade dos hidrogéis foi avaliada utilizando células endoteliais de veias humanas imortalizadas (HUVEC) e os resultados mostraram que os hidrogéis foram biocompatíveis e apresentaram resistência mecânica suficiente para manuseio e substituição de órgãos, ou partes de órgãos. O estudo avaliou a potencialidade de aplicação de hidrogéis de celulose bacteriana na engenharia de tecidos, porém não foram abordados possíveis usos para agricultura celular.

Tabela 1. Tipos de *Scaffolds*, matérias primas utilizadas e condições de fabricação.

Tipo de <i>Scaffold</i>	Matéria prima	Exemplos de aplicação	Composição do <i>Scaffold</i>	Condições de fabricação	Referência
Micro carreadores	Baseados em polímeros	Micro carreadores solúveis	Micro carreadores solúveis, com 5000 cm <sup>2</sup> g de área superficial, foram utilizados para apoiar o crescimento celular. Foram testados micro carreadores solúveis não revestidos e Synthemax II revestido. Eles foram hidratados por 1 h.	<p>O microcarreador sem revestimento foi revestido com Matrigel (1:30<sub>(v/v)</sub> em meio de cultura) ou Vitronectina humana recombinante (VTN-N, 0,5 µg cm<sup>2</sup> de área de micro carreador em solução salina tamponada com fosfato) por 2 h à temperatura ambiente e sob agitação. Os micro carreadores foram esterilizados por 1 h com Etanol 70% à temperatura ambiente e lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato.</p> <p>O revestimento dos micro carreadores foi realizado por 2 h em temperatura ambiente com VTN-N (0,5 µg cm<sup>2</sup> da área do micro carreador) em solução salina tamponada com fosfato. Antes da inoculação celular, os micro carreadores foram incubados em meio de cultura por 30 min a 37 °C.</p>	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2019)
		GdPO4·H2O/PLGA	PLGA (10%, PLGA/NMP, p/v) e diferentes concentrações de nanopartículas de GdPO4 H2O (0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8% e 1,6% Gd/PLGA, p/v) dispersos	Preparados utilizando uma técnica eletrostática de alta tensão, com tensão igual a 8,5 kV e velocidade de impulso 0,1 cm/ min. Após a lavagem com água destilada, os micro carreadores foram desidratados à vácuo e armazenados a 4 °C.	(Zhu <i>et al.</i> , 2022)

			em N-2-metil pirrolidona por ultrassom.		
		Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)(PLCL)	<p>PLCL e canfeno foram dissolvidos em diclorometano com uma concentração de 2 % p/v.</p> <p>Solução aquosa de PVA foi preparada por dissolução em água destilada a 2 % p/v.</p>	<p>As taxas de fluxo de volume das fases internas de óleo (Qi) e externas contínuas (Qo) foram definidas para 10 e 30 ml/h, respectivamente, e controladas por bombas de seringa. Formaram-se gotículas de óleo PLCL canfeno na coleta capilar, posteriormente adicionou-se solução aquosa de PVA (2 % p/v). Após o solvente diclorometano ser evaporado completamente, e as microgotículas estabelecidas no fundo do copo serem solidificadas, elas foram lavadas com água deionizada para remover o PVA. Então, os micro carreadores porosos de PLCL foram obtidos por liofilização durante 12h. Os micro carreadores foram armazenados à 20°C.</p>	(An <i>et al.</i> , 2023)
Baseados em plantas ou fungos	Proteína hidrolisada de grão de bico	<p>As proteínas vegetais foram hidrolisadas por tripsina em banho-maria com substrato enzimático 1% (E/S%) em 5% de dispersão proteica.</p> <p>Após a hidrólise, as enzimas foram desativadas por aquecimento. Os hidrolisados foram centrifugados duas vezes e os sobrenadantes foram coletados e armazenados</p>	<p>Micro esferas de alginato eletropulverizadas foram revestidas com uma variedade de hidrolisados de proteínas. Foram utilizados nove tipos de hidrolisados, incluindo: hidrolisado de proteína de feijão mungo, hidrolisado de proteína de soja, hidrolisado de proteína de lentilha vermelha, hidrolisado de proteína de grão-de-bico, hidrolisado de</p>	(Kong <i>et al.</i> , 2023)	

			para revestimento de micro carreadores. A proteína hidrolisada de grão de bico foi tratada com hidrólise sequencial: após a hidrólise da tripsina, o hidrolisado desativado foi tratado com carboxipeptidase B com substrato enzimático 0,2% (E/S%) na dispersão proteica. As enzimas foram desativadas por aquecimento e a solução resultante foi armazenada em geladeira para uso posterior.	proteína de ervilha e colza (dois tipos). Após o revestimento, as microesferas foram coletadas usando um filtro de células de 70 µm, seguido por 3 rodadas de lavagem com água.	
		Alginato ou alginato oxidado	Os grânulos de gel foram preparados através de um sistema de eletropulverização, utilizando uma solução de alginato a 2% p/v ou uma solução de alginato oxidado a 2% p/v.	As soluções foram exsudadas em 10 mL/h usando uma única bomba da seringa através de uma agulha 30G com uma tensão fixa de 4,2 kV. As micro gotas resultantes foram polimerizadas por imersão em um banho de gelificação com cloreto de cálcio agitado de 135 mM. Após a coleta, os grânulos foram lavados duas vezes com cultura de C3A e armazenados nesta mesma solução durante uma hora antes da utilização, evitando desidratação e garantindo o estado estacionário das propriedades que foram alcançadas.	(Lucena-Thomas <i>et al.</i> , 2020)
		Flores de brócolis	1 g das flores de brócolis foi colocado em um tubo de 50 mL contendo 45 mL de	A solução foi agitada por 48 h e resfriada durante 24 h. A solução de descelularização foi	(Thyden <i>et al.</i> , 2022)

			<p>água deionizada, dodecil sulfato de sódio 10% p/v, Polissorbato 20 3% p/v e de alvejante 10% p/v.</p>	<p>aspirada das amostras e os flocos foram transferidos para um copo de 2 L contendo água deionizada por pelo menos 1 h, trocando a água a cada 15 min.</p> <p>As amostras foram armazenadas em água deionizada à temperatura ambiente.</p>	
<b>Scaffold poroso</b>	Baseados em polímeros	Poliuretano	<p>Para a obtenção do <i>scaffold</i> poroso de poliuretano, foi utilizada a técnica de fundição por solvente/lixiviação de partículas (SC/PL) combinada com a técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS). Poliuretano foi dissolvido em 1,4-dioxano na concentração de 20% em p/v. Em seguida, cloreto de sódio (NaCl), de tamanho de cristais na faixa de 0,6-0,4 µm, foi adicionado à solução de poliuretano até a saturação completa da solução.</p>	<p>A solução saturada de sal formulada foi transferida para o molde de aço inoxidável do tamanho 2,5 x 2,5 x 2,5 cm e colocada a -20 °C por 24 h para direcionar a cristalização do solvente e fabricar <i>scaffolds</i> de anisotropia local onde a porosidade dos <i>scaffolds</i> e tamanho de poro são controlados. Em seguida, o <i>scaffold</i> foi removido do molde e imerso em água quente (40-50 °C) destilada, onde durante 7 dias os cristais de NaCl foram lavados. A água foi trocada duas vezes ao dia. Finalmente, as amostras foram secas a 60 °C por 24 h.</p>	(Kucinska-Lipka <i>et al.</i> , 2017)
		Microesfera de hidroxiapatita (sdHA) e ácido polilático (PLA)	<p>50% hidroxiapatita (HAP) e 50% ácido polilático (PLA).</p>	<p>O filamento compósito PLA/HAP, adequado para impressão 3D, foi obtido via fusão e extrusão de misturas PLA e HAP (relação 50/50 peso), utilizando uma extrusora dupla rosca contrarrotativa. O diâmetro do parafuso é 16 milímetros; a relação entre o comprimento do parafuso e o</p>	(Corciene <i>et al.</i> , 2019)

				<p>diâmetro, fornece uma indicação da residência/tempo de mistura do material, e é igual a 25 para o extrusor usado. A extrusora tem seis zonas térmicas de 60 mm de comprimento cada, que podem ser definidas independentemente em diferentes temperaturas. A temperatura de trabalho foi ajustada em 175 °C para as três primeiras zonas e, em seguida, aumentado em até 180 °C para a zona média, e até 200 °C para a última zona. Imediatamente após a saída da matriz circular (3 mm de diâmetro), o material foi resfriado a água e enrolado em um carretel. A fim de obter um filamento com um diâmetro constante de 1,75 mm, a distância entre a extrusora e o banho-maria foram mantidos constantes e iguais a 25 cm.</p>	
		Nanopartícula bioativa m-Hap e m-SiO <sub>2</sub> /policaprolactona	<p>As emulsões altas da fase interna foram preparadas conforme: PCL foi dissolvido em 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> utilizando ultrassom em banho-maria gelado para obtenção de uma solução. Em seguida, as nanopartículas de m-Hap e o m-SiO<sub>2</sub> foram uniformemente dispersas com ultrassom por 30 min</p>	<p>A impressão 3D foi realizada usando um desktop comercial e um distribuidor de três eixos. A emulsão alta da fase interna foi adicionada em um cartucho de uma seringa de polipropileno equipada com um pistão e uma agulha cônica (diâmetro interno de 0,51 mm). Posteriormente, a seringa foi fixada no dispensador e conectada ao sistema de</p>	(Hu <i>et al.</i> , 2019)

			<p>para obter a fase de óleo. 9 mL de água foram adicionados em grupos na fase do óleo e emulsionado então imediatamente por um misturador de vórtice a 3500 rpm. As concentrações utilizadas de nanopartículas m-Hap foram 0, 7.5, 10, 12.5 e 15 p/v%, respectivamente; de PCL foram 6, 8, 10 e 12 p/v%, respectivamente e de nanopartículas m-SiO<sub>2</sub> foram 0, 1, 1.5 e 2 p/v%, respectivamente.</p>	<p>controle de dispensação do eixo. A emulsão alta da fase interna foi impressa camada por camada em um painel de vidro em temperatura ambiente para construir os <i>scaffolds</i>. A velocidade de impressão linear foi definida para 30 mm/s, enquanto as pressões de extrusão na faixa de 20 a 100 kPa foram ajustadas para cada emulsão durante o processo de impressão 3D. Após a impressão 3D, os <i>scaffolds</i> foram colocados em uma capa de fumaça à temperatura ambiente por 24 h para remover solventes. Três lotes foram impressos para cada composição de emulsão.</p>	
	Baseados em plantas ou fungos	Goma ghatti	<p>Os <i>scaffolds</i> cerâmicos de hidroxiapatita (HAP) foram fabricados usando goma ghatti (GG) natural como aglutinante e esponja de poliuretano (PU) como modelo orgânico.</p>	<p>Para a síntese, o pó de HAP (tamanho de 100 nm) foi triturado e misturado com etanol e, em seguida, adicionado a 5 e 10% em soluções aquosas de GG a 50 °C com agitação por 2 h para formar uma pasta homogênea. Em seguida, esponjas de PU de 10 mm<sup>3</sup> de tamanho com um diâmetro médio de poro de 500 mm foram imersas na suspensão algumas vezes até que a remoção completa dos espaços vazios fosse alcançada. As esponjas foram removidas da suspensão e foram mantidas abundantemente carregadas</p>	(Lett <i>et al.</i> , 2020)

				<p>com ela. As amostras de corpo verde foram secas imediatamente, primeiro a 150 °C por 20 min usando um fluxo de ar, seguido de secagem ao ar à temperatura ambiente. A adição de GG como um agente obrigatório à pasta ajuda a aumentar e a controlar a porosidade final, em particular na superfície da amostra. Assim, os corpos verdes secos à temperatura ambiente foram submetidos ao aquecimento em um forno a 600 °C por 2 h para queimar a fase orgânica e finalmente sintetizados em um forno de mufla a 1100, 1150 e 1200 °C por 4 h para adquirir um scaffold com a resistência mecânica necessária. <i>Scaffolds</i> circulares de HAP de 0,5 mm de diâmetro e 0,3 mm de espessura foram preparados.</p>	
		Semente de marmelo à base de glucuronoxilana	<p>As cascas das sementes foram misturadas com água para concentrações variáveis de hidrogel de semente de marmelo à base de glucuronoxilana (1, 1,5, 2, 3,3, 5 e 10 mg/mL).</p>	<p>As sementes foram seca em temperatura ambiente durante uma semana. Depois, foram batidas e preparadas as soluções. Após 24 h de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram filtradas com auxílio de gaze e foram liofilizadas por aproximadamente 72 h. Os hidrogéis de semente de marmelo à base de glucuronoxilana liofilizados</p>	(Guzelgulgen <i>et al.</i> , 2021)

				<p>foram posteriormente reticulados por glutaraldeído. Foram usados 0,03 M glutaraldeído para hidrogéis levemente reticulados ou 0,5 M glutaraldeído para hidrogéis fortemente reticulados, preparados em acetona contendo ácido clorídrico 0,05 M, e incubados por 30 min à temperatura ambiente. Os hidrogéis reticulados foram lavados com água por 3 vezes, e mantidos liofilizados.</p>	
		Pó de glutenina de trigo	<p>Pó de glutenina dissolvido em água com diferentes concentrações (2%, 3%, 4% e 5%, p/v). As soluções foram colocadas em banho-maria à 90 °C por 30 min, depois distribuídas em placas de 48 poços (0,5 mL/poço) para seguir para liofilização.</p>	<p>As soluções de glutenina preparadas a pH 3 com concentrações de glutenina de 2,5% em peso e 5% em peso foram transferidos para moldes em que uma chapa de aço separa um lado de uma câmara retangular (3,5 cm 2,5 cm 1,5 cm) do outro lado da câmara (3,5 cm 5,5 cm 1,5 cm). As soluções foram adicionadas a um lado da chapa de aço, e nitrogênio líquido foi adicionado ao outro para gerar congelamento da solução de glutenina. Elas foram congeladas e então liofilizadas à 80 °C. Por fim, os <i>scaffolds</i> fibrosos secos de glutenina com poros alinhados direcionalmente foram esterilizados à vapor por autoclavagem à 121 °C por 15 min e seco por 10 min.</p>	(Xiang <i>et al.</i> , 2022)

<p><b>Hidrogel</b></p>	<p>Baseados em polímeros</p>	<p>Alginato/poliacrilamida- quitosana-gelatina</p>	<p>Acrilamida em diferentes concentrações (40%, 50%, 60%, 70%, e 80%), alginato de sódio 2% (p/v), quitosana 1% (p/v) e gelatina 2% (p/v).</p>	<p>Os <i>scaffolds</i> foram preparados pela tecnologia de penetração de rede através de reticulação iônica de alginato de sódio e reticulação covalente de poliacrilamida, combinando com o conjunto eletrostático de camada por camada de biomacromoléculas. Uma certa quantidade de acrilamida, persulfato de amônio, tetrametiletilenodiamina, N'-metilenobisacrilamida e pó de hidroxiapatita foram gradualmente dispersos em solução de alginato de sódio 2% (p/v) sob agitação ultrassônica para obter uma solução homogênea. Então, a reticulação iônica de alginato de sódio foi iniciada pela adição de uma certa quantidade de glucono delta-lactona sob agitação magnética. Após agitação em alta velocidade durante 3 min, a mistura foi transferida para uma placa de cultura de tecido de 12 poços e ligada fisicamente a 4 °C durante 4 h. Depois disso, os hidrogéis foram transferidos para uma incubadora e aquecidos a 60 °C por 5 h para realizar a polimerização e reticulação covalente da poliacrilamida. O hidrogel resultante foi repetidamente lavado com água deionizada e</p>	<p>(Chen <i>et al.</i>, 2021)</p>
------------------------	------------------------------	--	--	--	-----------------------------------

				<p>depois liofilizado para obter o hidrogel composto de alginato e poliacrilamida seco. Posteriormente, a superfície do hidrogel foi coberta por imersão sucessiva em solução quitosana 1% (p/v) e solução gelatina 2% (p/v) na presença de 0,01 mol/L CaCl<sub>2</sub> por um período de 30 min. Após esse período, os <i>scaffolds</i> compostos de hidrogel foram incubadas em 1-etil-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida cloridrato/N-hidroxisuccinimida (10 mM/10 mM) durante a noite e depois lavados com água deionizada para remover qualquer impureza não ligada. Finalmente, os hidrogéis compostos molhados foram liofilizados para obtenção do <i>scaffold</i> de hidrogel composto.</p>	
		PTH(1-34)/PLGA/BMSCs/GelMA-PCL	<p>Células-tronco mesenquimais da medula óssea nucleada (BMSCs) foram subcultivadas e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A gelatina metacrilóil (GelMA) foi dissolvida em solução tamponada com fosfato em 40 °C para obter uma concentração de 100 mg/mL, com a adição de 0,25% (m/v) fotoiniciador</p>	<p>Impressora 3D foi utilizada para fabricar <i>scaffolds</i> compostos usando o hidrogel não reticulado como biotinta. O processo de impressão foi conduzido com o auxílio de um multi-bocal e controle de temperatura do sistema. O bocal de alta temperatura foi usado para depositar PCL em 80 °C, impresso alternadamente camada por camada. O bocal de baixa temperatura foi usado para</p>	(Fan <i>et al.</i> , 2023)

			<p>LAP. As microesferas de BMSCs foram encapsuladas separadamente no filtro esterilizado solução precursora de hidrogel em concentrações de <math>5 \times 10^{-6}</math> células/mL e 5 mg/mL, respectivamente. A solução foi reticulada por UV para formar os hidrogéis compostos.</p>	<p>expulsar a biotinta em 20 °C, com um intervalo de 10 s entre cada camada, permitindo a foto-ligação cruzada da biotinta e resfriamento do PCL. Os parâmetros de impressão foram definidos para produzir <i>scaffolds</i> semi-cilíndricos com um diâmetro de 6 mm, uma altura de 2 milímetros, e 20 camadas no total, com uma intensidade clara de 50 mW/cm<sup>2</sup>. Os grupos de <i>scaffold</i> foram divididos em três: PCL + GelMA, PCL + GelMA + BMSCs e PCL + GelMA + BMSCs + PTH.</p>	
		<p>Polianilina (PAni)-aminoácido trimetileno ácido fosfofônico (ATMP)</p>	<p>O hidrogel de polímero condutor induzido por aminoácido trimetileno ácido fosfofônico (ATMP) teve a seguinte composição: 0,46 mL 50% em peso de solução aquosa de aminoácido trimetileno ácido fosfofônico (<math>1,8 \times 10^{-3}</math> mol) e anilina (Ani) (<math>1,3 \times 10^{-3}</math> mol) foram inicialmente dissolvidos em 1 mL de água ultrapura sob tratamento de sonicação até obter uma solução transparente. Enquanto isso, 0,0715 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (<math>1,3 \times 10^{-3}</math> mol) foi adicionado em água ultrapura (0,5 mL) sob</p>	<p>Ambas as soluções foram armazenadas à 4 °C. Em seguida, elas foram misturadas em um eletrodo de carbono vítreo limpo para reagir durante 30 min a 4 °C. Para remoção de oligômeros o hidrogel foi imerso em água ultrapura por 30 min. Por fim, o hidrogel obtido foi seco em estufa à 40 °C.</p>	<p>(Xu <i>et al.</i>, 2019)</p>

			tratamento de sonicação até obter solução transparente.		
	Baseados em plantas ou fungos	Calos de cenoura	Calos de cenoura com solução alginato de sódio 4% (p/p) nas proporções 1:2, 1:1 e 2:1.	Os <i>scaffolds</i> foram impressos em 3D (comprimento/largura 40 mm; altura 3 mm) usando a incorporação reversível de forma livre de hidrogéis em suspensão, técnica desenvolvida por Hinton <i>et al.</i> , (2015), com pequenas modificações. Gelatina suína foi utilizada para suspender os hidrogéis. O pó de gelatina foi vertido em um volume suficiente de 40 mM CaCl <sub>2</sub> composto de meio líquido de 1/2 MS (meio Murashige e Skoog), mexendo constantemente e a solução foi armazenada durante a noite em uma geladeira a 4 °C para permitir hidratação suficiente. A dispersão da gelatina foi então centrifugada a 4200 rpm por 5 min. As biotintas de calos de cenoura preparadas em três proporções diferentes de alginato para conteúdo celular (1:2, 1:1 e 2:1 p/p) foram carregadas em uma seringa com 30 mL de capacidade. A biotinta à base de calos de cenoura foi impressa em <i>scaffolds</i> de rede 3D em um banho de suporte de pasta de gelatina. Após a impressão, as estruturas em gel ficaram embebidas no banho	(Park <i>et al.</i> , 2020)

				de pasta de gelatina por 1 h, para permitir que o alginato na biotinta fizesse ligação cruzada com os íons de cálcio no banho. Os <i>scaffolds</i> foram coletados e lavados três vezes com meio líquido 1/2 MS. Os parâmetros da impressão foram ajustados como segue: altura da camada de 0,9 mm, bocal de 1,0 mm diâmetro, velocidade do bocal de 20 mm/s e nível de enchimento de 60%. <i>Scaffolds</i> de treliça foram projetados no formato de arquivo de estereolitografia.	
		Cultura celular in vitro de manjeriço combinada com alginato, agarose e metilcelulose (Alg/Aga/mc)	Uma mistura de hidrogel de Alg/Aga/mc foi desenvolvida contendo alginato (2,8%), agarose (0,9%) e metilcelulose (3%).	Foi feita impressão 3D baseada em extrusão. As biotintas de hidrogel foram dispensadas através de uma dosagem em agulha cônica, diâmetro interno de 610 µm, aplicando uma velocidade de plotagem de 8-10 mm/s e uma pressão de dosagem de 80-100 kPa. Camadas sucessivas foram deslocadas em 90 para obter estruturas de grade. Os andaimes foram plotados em 6 poços ao ar como ambiente de plotagem. A reticulação do alginato foi obtida após a conclusão da plotagem por incubação dos <i>scaffolds</i> em solução de CaCl <sub>2</sub> 0,1 M contendo 3% em peso de sacarose por 10 min. Posteriormente, os <i>scaffolds</i>	(Seidel <i>et al.</i> , 2017)

				foram lavados duas vezes por 1 min em meio MS (meio Murashige e Skoog) para culturas de células vegetais.	
		Glucomanano de konjac (KGM), proteínas do cabelo humano (KER), e um extrato etanólico de <i>Avena sativa</i> (OAT)	Dois conjuntos de <i>scaffolds</i> de hidrogel foram fabricados, um contendo apenas glucomanano de konjac e queratina (KGM + KER), e o outro contendo glucomanano de konjac, queratina e extrato de <i>Avena sativa</i> (KGM + KER + OAT).	Uma mistura dos materiais foi preparada dissolvendo 240 mg de KGM, 400 mg de KER e a quantidade necessária de extrato de aveia (0 ou 200 mg) em 18 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de solução de NaOH a 30% e 15% de trimetafosfato de sódio (STMP). STMP é um reticulador seguro para alimentos que forma ligações de fosfato entre grupos hidroxila intermoleculares. A solução foi então agitada e vertida em moldes de Teflon, armazenados em 20 °C por 12 h, e liofilizados a 100 °C e 0,005 mbar por 24 h. Após a liofilização, o <i>scaffold</i> foi lavado repetidamente com água destilada para remover o NaOH. O hidrogel lavado foi re-liofilizado para obter a forma final do <i>scaffold</i> .	(Veerasubramanian <i>et al.</i> , 2018)
<b>Scaffold fibroso</b>	Baseados em polímeros	Pigmento melanina e o polímero natural Poli-3-hidroxibutirato (PHB)	PHB foi preparado em clorofórmio e dicloroetano (9% p/v) pelo aquecimento suave em banho de água quente, a solução obtida foi agitada por 4-5 h. Separadamente, uma solução polimérica de	A eletrofiação foi usada para fabricar o <i>scaffold</i> . A solução de polímero obtida foi carregada em uma seringa de vidro equipada com uma agulha de ponta plana de calibre 22 para evitar efeito de descarga pontual. A solução	(Agrawal <i>et al.</i> , 2022)

			<p>melanina (4% p/v) foi preparada em hexafluoro-2-propanol (HFIP) e dimetil sulfóxido (DMSO). Essa solução foi adicionada à solução de PHB e a solução resultante foi agitada durante a noite.</p>	<p>polimérica foi desenhada utilizando bomba de seringa a uma taxa de 0,8 mL h<sup>-1</sup>, sob alta potência elétrica (18 kV). A distância entre a ponta da agulha e o coletor aterrado foi ajustado para 18 cm. A temperatura de 25±2 °C e a umidade relativa (%) da câmara de giro foi mantida constante (em torno de 50%) durante a eletrofiação. As amostras foram recolhidas sobre uma folha de alumínio e armazenado em um dessecador à vácuo para remover os solventes residuais.</p>	
		Mantas fibrosas de policaprolactona (PCL)	<p>Foi preparada uma solução de policaprolactona 4% p/v em clorofórmio.</p>	<p>Os <i>scaffolds</i> foram feitos por eletrofiação. O bico foi conectado ao compressor de ar e na bomba de seringa, onde a solução foi colocada. Os parâmetros utilizados no processo foram taxa de 30 µL/min, distância do bocal ao coletor de 10 cm, e pressão de 30 psi. Optou-se por manter uma deposição de fibra estática, para restringir as variáveis do sistema e permitir uma melhor comparação técnica de aerografia. O aerógrafo foi acoplado ao compressor de ar, e a solução foi despejada no reservatório.</p>	(Hell <i>et al.</i> , 2018)
		Poli(vinilpirrolidona) (PVP) e Poli(glicerol sebacato) (PGS)	<p>O PGS foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) para</p>	<p>Um dispositivo de eletrofiação customizado sem bico composto por um eletrodo de</p>	(Keirouz <i>et al.</i> , 2019)

			<p>formar solução 15% p/v de polímero. O PVP com massas molares de 360 k e 1,3 M g/mol foi resolvido separadamente em um sistema solvente com relação 1:1:0,25 p/v de dimetilformamida (DMF): Etanol: água destilada para formar solução polimérica de 11,75% p/v. Todas as soluções foram agitadas durante a noite à temperatura ambiente, antes da mistura. Em seguida, misturas de 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 40:60 e 50:50 p/p de PVP:PGS foram preparadas e misturadas por 12 h antes da eletrofição.</p>	<p>cilindro de aço inoxidável rotativo dentro de uma piscina de Teflon, onde as misturas de solução de polímero foram imersas e um eletrodo de coletor rotativo sob fluxo constante de ar quente (distância de trabalho 15 cm, fluxo de ar 450 L min<sup>-1</sup>, temperatura 150 °C). Uma diferença de potencial de 60 kV DC foi aplicada entre os dois eletrodos rotativos (+30 kV no eletrodo dentro da piscina e 30 kV no eletrodo coletor), resultando na formação de vários cones Taylor na superfície do eletrodo rotativo imerso no banho de solução, a partir do qual os jatos se esticaram para formar fibras em um movimento ascendente. Um papel à base de celulose foi usado para coletar as fibras. Todos os experimentos foram realizados sob condições ambientais em uma umidade relativa que varia de 30-40% e temperatura ambiente de 18-22 °C. A irradiação UV dos <i>scaffolds</i> PVP:PGS foi transmitida para induzir a reticulação dos dois polímeros eletrofiados distintos. Soluções contendo 0,2 a 1% p/p de riboflavina também foram preparadas como</p>	
--	--	--	---	--	--

				<p>fotossensibilizador enzimático.</p> <p>As membranas foram irradiadas na faixa de dose de 5 kGy por 30 e 60 min a uma distância de 15 cm entre a superfície exposta e a lâmpada halógena, utilizando uma lâmpada UV de 254 nm.</p>	
	Baseados em plantas ou fungos	Acetato de celulose (CA) e hidrolisado de proteína de soja (SPH)	Acetato de celulose (CA) 10% p/v e hidrolisado de proteína de soja (SPH) em diferentes concentrações: 1, 3 e 5% p/v.	<p>As nanofibras híbridas à base de plantas foram fabricadas por co-fiação de acetato de celulose e hidrolisado de proteína de soja em hexafluoroisopropanol (HFIP) usando um sistema de fiação giratória à jato, que produz nanofibras livres de defeitos sob forças de cisalhamento induzidas por centrifugação.</p> <p>As nanofibras de CA e CA/SPH foram giradas em uma escala de centímetros, expulsando a solução do polímero de um reservatório giratório. Experimentos com velocidade de rotação e injeção mostraram que a adição de 10% p/v CA a várias concentrações de SPH (1, 3, 5 p/v%) resultou na formação contínua do <i>scaffold</i> nano fibroso. Os <i>scaffolds</i> desenvolvidos apresentaram uma estrutura intercalada que se assemelha à matriz extracelular real.</p>	(Ahn <i>et al.</i> , 2018)

		Tapetes miceliais fúngicos com paredes celulares de polissacarídeo quitina-glucano	<i>Aspergillus sp.</i>	Os tapetes miceliais fúngicos foram cortados em círculos de 3 mm de espessura e 5 mm de diâmetro, desidratados usando uma série de etanol graduado (10 min em 20%, 40%, 60%, 80%, 90% e 2x100%), autoclavadas a 121 °C por 15 min e liofilizados durante a noite. Os <i>scaffolds</i> fúngicos obtidos foram então tratados com agente redutor, β-mercaptoetanol (BME) (0,45 M) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, a 37 °C por 16 h para solubilizar proteínas associadas à hifa e lavadas várias vezes em solução salina tamponada com fosfato de dulbecco (DPBS)(pH 7).	(Narayana <i>et al.</i> , 2020)
		Zeína (proteína do milho)	Foram preparadas soluções de zeína para eletrofiliação com solventes benignos, etanol e água, e com o éter trimetilpropano triglicídico reticulador (TMPGE).	A proteína zeína purificada foi dissolvida em álcool desnaturado 80/20/água deionizada por agitação magnética contínua por 1,5 horas à temperatura ambiente. 10% (p/p com base no peso seco da zeína) do reticulador TMPGE foi adicionado à solução de zeína e agitado por 15 min antes da eletrofiliação. A configuração de eletrofiliação consistiu em uma bomba de infusão de seringa única, uma seringa contendo as soluções preparadas, uma agulha de metal de calibre 18 presa à seringa, uma fonte de	(Turner <i>et al.</i> , 2019)

				<p>alimentação de alta tensão e uma placa de metal aterrada para o coletor. A solução polimérica foi ejetada a uma vazão de 2,5 ml/h, enquanto a tensão aplicada à agulha ficou entre 17 kV e 20 kV. O coletor foi mantido a uma distância de 25 cm da ponta da agulha e conectado ao solo. Após a eletrofiação, os <i>scaffolds</i> de zeína contendo 10% de TMPGE foram curados em temperaturas de até 150 °C por 4,5 h em forno a vácuo. A temperatura de cura foi gradualmente aumentada em 10 °C/h, sendo a temperatura inicial de 120 °C e mantida a 150 °C durante 1,5 h. A reação amina-epóxi é exotérmica; assim, o aumento gradual na temperatura de cura limita o calor acumulado dentro das esteiras de eletrofiação e a degradação térmica da proteína é evitada. Os <i>scaffolds</i> foram armazenados em dessecadores aspirados até uso posterior.</p>	
--	--	--	--	---	--

Fonte: Adaptado de Bomkamp *et al.* 2021.

## 5. MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS

Para se atingir esses formatos de *scaffolds* várias técnicas podem ser empregadas, como bioimpressão 3D, micro fluídica, liofilização, cultura dinâmica (em biorreatores), eletrofiação, e até abordagens livres de *scaffolds*. Essas técnicas e os princípios em que são baseadas estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Métodos de estruturação de *scaffolds*.

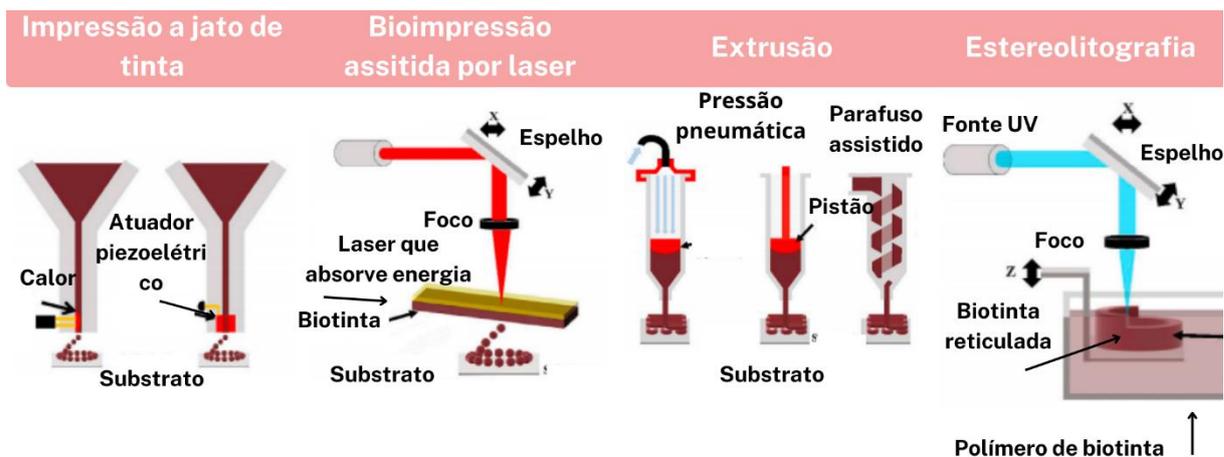


Fonte: Autoria própria, 2023.

### 5.1 BIOIMPRESSÃO 3D

Usado pela primeira vez em 1986 por Charles W. Hull, a bioimpressão 3D é um processo que consiste em criar um modelo camada por camada a partir de um desenvolvimento feito em computador (Matai *et al.*, 2020). A bioimpressão 3D pode ser feita por diferentes métodos: jato de tinta, bioimpressão assistida por laser (LAB), extrusão e estereolitografia. O funcionamento de todos esses métodos estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3. Métodos de bioimpressão 3D para *scaffolds*.



Fonte: Adaptado de Matai *et al.* (2020).

As diferentes abordagens de bioimpressão 3D requerem biotintas adequadas, otimizadas para garantir a fidelidade celular do *scaffold* impresso enquanto suporta a viabilidade celular. Biotintas usadas em alimentos incluem biopolímeros como gelatina (Wang *et al.*, 2017), agarose (Nadernezhad *et al.*, 2019), celulose (Wang *et al.*, 2020), alginato (Axpe & Oyen, 2016), pectina (Andriotis *et al.*, 2020) e proteínas de plantas como a soja (Chien *et al.*, 2013). Esses biopolímeros possuem mecanismos de reticulação, permitindo a formação de um hidrogel estável na construção impressa, enquanto a biotinta mantém suas propriedades desejadas de fluido. Esses polímeros podem, também, sofrer reticulação térmica, como no caso da agarose, ou gelificação baseada no pH, como a pectina. A celulose pode ser reticulada por diferentes maneiras, como radiação UV, uso de enzimas ou íons de cálcio (Wang *et al.*, 2020).

Outra consideração que deve ser feita na bioimpressão 3D de carne cultivada é a estabilidade da estrutura impressa durante o processamento posterior e durante os processos de cocção (Handra *et al.*, 2020). Por fim, a versatilidade, precisão e reprodutibilidade da bioimpressão 3D mostram que é um método promissor para a produção de carne cultivada.

Embora a impressão 3D tenha sido demonstrada para uma ampla variedade de materiais, a maioria das biotintas relevantes para carne cultivada são as baseadas em hidrogéis. Hidrogéis baseados em uma composição de mistura de proteína isolada de soro de leite e goma gelana, foram investigadas quanto ao seu uso potencial em aplicações de bioimpressão de alimentos (Oliveira *et al.*, 2020). Colágeno/gelatina (Kang *et al.*, 2021) e ácido hialurônico (Ouyang *et al.*, 2016), ambos encontrados naturalmente em tecidos de mamíferos, também foram estudados como biotintas ou componentes de biotintas. Por causa das forças de cisalhamento exercidas nas células quando elas são impressas em uma tinta viscosa, juntamente com o fato de que a

viscosidade é necessária para que a construção impressa mantenha sua forma, hidrogéis reticuláveis têm sido investigados como uma abordagem possível para a impressão de estruturas complexas, mantendo a viabilidade celular. A bioimpressão oferece certas vantagens relacionadas à indução do alinhamento dos miotubos (Kim *et al.*, 2020) e à criação de canais semelhantes a vasos (Skylar-Scott *et al.*, 2019).

Um hidrogel é uma matriz polimérica hidrofílica, sendo reticulada por meios físicos ou químicos e com capacidade de retenção de água. Os hidrogéis são muito importantes na engenharia de tecidos pois possuem requisitos indispensáveis. Para utilização na carne cultivada, a matriz polimérica deve ser cito compatível, constituída de biomateriais não tóxicos. Os micronutrientes e moléculas de sinalização devem ser capazes de alcançar as células por todo o tecido, e para tal a cinética de difusão do hidrogel deve permitir que essas moléculas penetrem em toda a espessura do hidrogel nas concentrações e taxas exigidas para células de suporte. A rigidez é um fator importante para um hidrogel, pois pode afetar a motilidade celular, proliferação, diferenciação e a migração (Freeman *et al.*, 2017; Levy-Mishali *et al.*, 2009), uma vez que as células devem ser capazes de remodelar o hidrogel durante a maturação do tecido. Idealmente, as células degradam o hidrogel durante um período de tempo apropriado e sintetizam o tamanho da sua própria matriz extracelular. Sítios proteolíticos devem ser incorporados ao hidrogel para facilitar a adesão celular e migração. Em estudos recentes foram destacados os seguintes usos para hidrogéis: usado para criação de um ambiente 3D semelhante ao da matriz extracelular (Simsa *et al.*, 2019; Furihashi *et al.*, 2021), como enchimento de matriz extracelular 3D dentro de *scaffolds* porosos (Hickey *et al.*, 2018), como componentes de biotintas (Kim *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2021), como membranas finas que podem ser micro estruturadas para produzir alinhamento de células (Orellana *et al.*, 2020), ou como material de origem para desenvolver *scaffolds* porosos (Ben-Ayre & Levenberg, 2019; Kanematsu *et al.*, 2004). Os hidrogéis sintéticos são comumente usados para fins de engenharia de tecidos devido às suas propriedades biológicas inertes que impedem uma resposta imune. Hidrogéis compostos podem mimetizar melhor a matriz extracelular e mostram propriedades melhoradas em comparação com as compostas por um único material (Bomkamp *et al.*, 2021).

O método 3D mais utilizado é a bioimpressão baseada na extrusão (EBB), principalmente por ser versátil, simples e de baixo custo. Nesse método, a biotinta é liberada por um sistema robótico controlado por computador, o que resulta na deposição precisa e contínua de filamentos cilíndricos (Murphy & Atala, 2014; Cui *et al.*, 2020). O fator limitante para o uso deste método é o tempo de impressão lento e o retorno mais baixo da viabilidade

celular, quando comparado com os demais métodos apresentados, que fica entre 40 e 86%. A bioimpressão baseada na extrusão pode ser feita com diferentes técnicas (Cui *et al.*, 2020). O gel extrusado com frequência se espalha após a sua deposição, exigindo um método de fixação a fim de garantir a estabilidade da estrutura impressa. Esses métodos de fixação podem ser a fotopolimerização ou por imersão da impressão em uma solução de agente de reticulação (Cui *et al.*, 2020).

No método de impressão 3D por jato de tinta, gotas pequenas de tinta líquida são produzidas e depositadas no substrato. Esse método de bioimpressão 3D é considerado versátil e acessível, é preciso e atinge boas resoluções, o que retorna uma viabilidade celular entre 70 e 96%. Ainda assim, existem limitações quanto ao seu uso, principalmente em relação à biotinta que será utilizada. A biotinta precisa ter viscosidade baixa, e possuir um mecanismo de reticulação para estabilizar a estrutura impressa. Outras limitações são o bocal pequeno, o que leva a entupimentos e dificuldade na limpeza, dificultando a produção e reduzindo a eficiência em uma fabricação de larga escala. Esse método é baseado em imprimir múltiplas e não contínuas gotas, e essa falta de integridade mecânica faz com que não seja favorável o seu uso para impressão de carne cultivada (Levi *et al.*, 2022).

Em seu estudo, Chen *et al.* (2019) demonstraram a fabricação de *scaffolds* utilizando o método de impressão 3D por jato de tinta. Eles usaram o ácido polilático-co-glicólico (PLGA) para criar um ambiente que fornece as condições adequadas de crescimento, diferenciação e sobrevivência de mioblastos C2C12. Sabe-se que o PLGA é um polímero capaz de simular a estrutura complexa da matriz extracelular. Os resultados mostraram que nos *scaffolds* impressos em 3D a taxa de sobrevivência foi maior do que no controle feito em filmes e esferas de PLGA. Além disso, foi observado que esses *scaffolds* possuem uma arquitetura controlada e uniforme, provando que a impressão 3D é uma ferramenta adequada para fabricação de *scaffolds* de cultura de células com estrutura definida. Foram variadas as lacunas fibrilares (30, 50, 150 e 200  $\mu\text{m}$ ) e os efeitos em relação à adesão celular e proliferação do C2C12 foram testados após sete dias de cultivo. O *scaffold* com lacuna fibrilar de 50  $\mu\text{m}$  foi o mais adequado, pois demonstrou aumento da adesão e proliferação celular em comparação com os demais.

A bioimpressão assistida por laser (LAB) é baseada na deposição da biotinta líquida em uma superfície revestida de metal, seguida por uma cavitação induzida à laser na fita, o que resulta na formação de uma micro gotícula de biotinta. A LAB preserva a viabilidade celular em mais de 95%, e é compatível com biotintas com uma grande faixa de viscosidade, entre 1 a 300 mPa/s, e por sua deposição ser feita sem bico, o entupimento não é um problema para esse

método. Um dos problemas é o custo do laser e a sua dificuldade de controle. Outra limitação no seu uso é o resíduo metálico no produto final, o que é uma preocupação em relação a segurança do produto final, restringindo o uso de LAB para produção e comercialização de carne cultivada (Hakobyan *et al.*, 2020).

Outro método de impressão 3D que utiliza laser é a estereolitografia, que consiste na utilização de uma matriz de micro espelhos digitais para ajustar a intensidade do feixe de luz visível ou ultravioleta (UV), curando polímeros fotossensíveis de camada em camada. Esse método é rápido, barato e retorna uma viabilidade celular acima de 85%. Uma das limitações de seu uso é por meio dos agentes bloqueadores de luz, eles são usados para padronização fotorresistente na estereolitografia e não são adequados para uso em alimentos por serem tóxicos e cancerígenos (Grigoryan *et al.*, 2019).

## 5.2. MICRO FLUÍDICA

A micro fluídica é uma área da tecnologia que se dedica ao estudo e manipulação de pequenos volumes de fluído em sistemas em miniatura, utilizando canais com dimensões com entre  $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  litros. Esses canais são utilizados para a mistura de compostos químicos, através de uma técnica de bombeamento, visando a síntese e separação de substâncias. Ao contrário das macro escalas, onde as características físicas e a transferência de massa baseadas em difusão são escaláveis linearmente, na micro escala, essas propriedades não podem ser extrapoladas diretamente. A principal vantagem da técnica micro fluídica é a obtenção de fluxo laminar, que é um fenômeno impossível de alcançar em dispositivos de grande escala, devido à predominância das forças viscosas (Chiesa *et al.*, 2018).

Para construir as plataformas micro fluídicas, materiais como silício monocristalino e vidro borossilicato são comumente utilizados devido às suas características físico-químicas adequadas. Além disso, polímeros têm sido amplamente empregados na fabricação desses dispositivos, sendo o polidimetilsiloxano (PDMS) um dos mais favoritos. O PDMS pode ser facilmente moldado e modelado em canais com alta precisão em termos de tamanho de micrômetros, é transparente à luz e tem baixa permeabilidade à água. Entretanto, uma desvantagem importante do PDMS é sua falta de resistência a solventes orgânicos, como aminas, ácidos fortes e hidrocarbonetos, o que levou ao desenvolvimento de reatores microfluídicos resistentes a solventes (Kim *et al.*, 2009; Greener *et al.*, 2010).

No contexto da mistura induzida pelo fluxo laminar, uma das características cruciais para melhorar o desempenho dos dispositivos em microescala, os micro misturadores podem

ser classificados em ativos e passivos. Os misturadores ativos utilizam fontes externas para agitar fisicamente o líquido em um micro canal, como ondas acústicas, ultrassônicas, distúrbios magnéticos ou de pressão (Kwak *et al.*, 2016; Bau *et al.*, 2001). Já os misturadores passivos manipulam os fluidos através de hidrodinâmica, aproveitando advecção caótica, difusão molecular aprimorada, tensão superficial, laminação fluida, divisão sequencial e combinação de fluidos dentro do micro canal. Os micro misturadores caóticos baseados em advecção caótica passiva são os mais utilizados devido ao seu design e fabricação simples, além de apresentarem maior eficiência de mistura. Esses micro misturadores têm geometrias embutidas no microcanal que perturbam o fluxo laminar para promover a mistura efetiva de substâncias (Chiesa *et al.*, 2018).

Kankala *et al.* (2019) foram motivados pela falta de pesquisas sobre a aplicabilidade dos micro carreadores porosos e, como resultado, eles fabricaram microesferas com poros altamente abertos usando uma técnica micro fluídica. Essas microesferas foram projetadas para abrigar estruturas esqueléticas em proliferação de mioblastos e foram posteriormente avaliadas quanto à sua viabilidade na entrega de células. As microesferas biocompatíveis produzidas possuem tamanhos de partícula entre 280 e 370  $\mu\text{m}$  e apresentam poros com dimensões entre 10 e 80  $\mu\text{m}$ . Essa estrutura proporciona um microambiente favorável, permitindo que as células estejam intimamente dispostas em formas alongadas com a matriz extracelular depositada, o que facilita a adesão, proliferação e diferenciação miogênica aumentada das células. O uso de polímero PLGA (poli (ácido lático-co-glicólico)) na fabricação das microesferas porosas permitiu a obtenção de um sistema de entrega celular minimamente invasivo, adequado para regeneração tecidual. O estudo demonstrou uma alta taxa de adesão celular, proliferação contínua e aumento da diferenciação miogênica dos mioblastos esqueléticos C2C12 quando organizados em camadas fibrosas nas microesferas porosas. Além disso, as microesferas porosas apresentaram uma matriz extracelular estabelecida e exibiram um forte potencial para a diferenciação de mioblastos em camundongos, o que facilitou o crescimento dessas células musculares esqueléticas concomitantemente com a vascularização.

### 5.3 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um processo de secagem, em que um solvente, geralmente água, é retirado de um produto por sublimação (Akers, 2015). Esse processo já tem sido utilizado para fabricação de *scaffolds* porosos voltados para a área da biomedicina, em várias aplicações como

estudo de câncer *in vitro*, reconstrução de tecidos, regeneração de ossos e vascularização (Rnjak-Kovacina *et al.*, 2015).

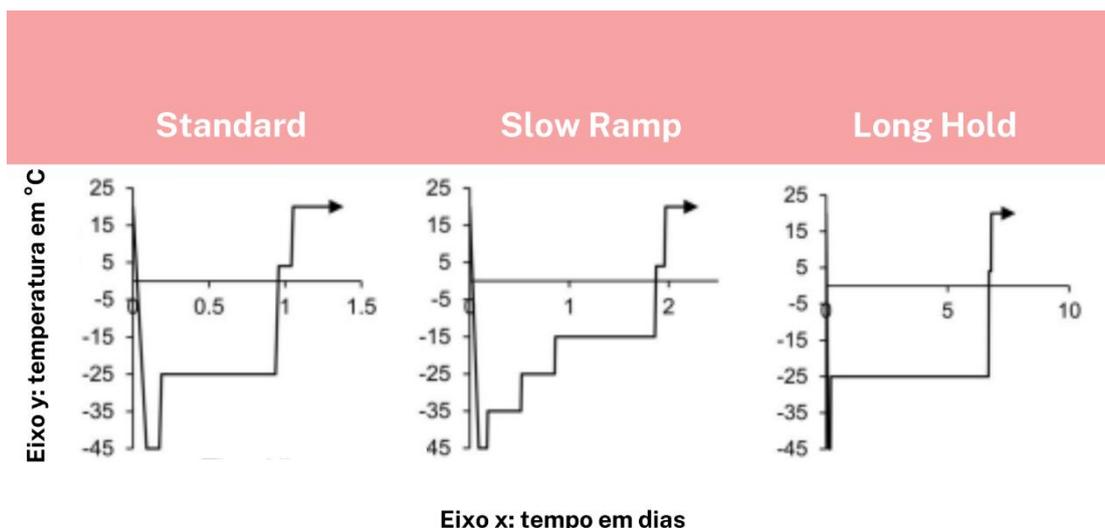
Os *scaffolds* porosos possuem estrutura similar a uma esponja, com um tamanho de poro na casa de micrômetros (Zeltinger *et al.*, 2001). Essa estrutura fornece a estabilidade mecânica necessária para que as células cultivadas formem tecidos. Para a engenharia de tecidos, esses *scaffolds* se assemelham em estrutura, propriedades mecânicas e em composição ao tecido conjuntivo do perimísio (Ben-Ayre & Levenberg, 2019), considerando que o *scaffold* ainda permaneceria como componente do tecido maduro. Técnicas de fabricação de *scaffolds* porosos comumente usadas, como lixiviação de partículas, moldagem por fusão, liofilização e formação de espuma de gás (Loh *et al.*, 2013), usualmente usam polímeros sintéticos, que devem ser substituídos por comestíveis (Shit *et al.*, 2014) para uso na carne cultivada. O tamanho dos poros, a porosidade e o material do *scaffold* são fatores-chave que afetam o desenvolvimento dos tecidos e a sobrevivência das células. Enquanto o tamanho dos poros é importante para a cultura celular, a integração de poros maiores adequados para a perfusão do meio também deve ser considerada para a pseudo vascularização (Ellis *et al.*, 2007) para permitir o transporte eficiente de nutrientes e oxigênio em pedaços mais espessos de carne cultivada.

O processo de liofilização é dividido em três etapas, a solidificação, a secagem primária e a secagem secundária. Na primeira fase, a solidificação, a solução começa a ser resfriada a uma temperatura abaixo do seu ponto eutético, que é o ponto em que a amostra inteira está congelada. Posteriormente, na segunda fase, o vácuo é aplicado a fim de reduzir a pressão e facilitar o processo de sublimação. O processo todo é conhecido como uma transição de sólido para vapor, que começa na primeira fase. Durante a primeira secagem, a água não ligada é removida do material, deixando apenas uma estrutura porosa. Na terceira fase, a secagem secundária, a amostra é aquecida, facilitando a dessorção da água não ligada (Akers, 2016). Ainda sobre as etapas da liofilização, sabe-se que a secagem primária é a etapa lenta (Zhu *et al.*, 2018). Se o tempo estabelecido for inadequado na secagem primária, o conteúdo de solvente retirado será insuficiente, e o que restar na amostra será aquecido durante a secagem secundária, estragando a amostra. A temperatura também é um fator determinante na secagem primária. Tanto a temperatura quanto o tempo influenciam no tamanho de cristais formados, o que afeta a estrutura dos poros (Arsiccio *et al.*, 2017; Foerst *et al.*, 2019). A fase de secagem primária apresenta oportunidades adicionais para controlar as propriedades físicas do *scaffold*, monitorando as interações entre a amostra e a água ligada. Estudos anteriores demonstraram que a manipulação dessas interações, alterando as taxas de secagem e o tempo, afeta

consideravelmente a rigidez do *scaffold* e a formação da estrutura secundária (Yao *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012; Sohn *et al.*, 2004).

A otimização da secagem para vacinas e outras aplicações farmacêuticas já vem sendo estudada (Goldman *et al.*, 2018; Izutsu, 2018), mas para a fabricação de *scaffolds* ainda é um campo relativamente desconhecido (Abbott *et al.*, 2022). Em seu estudo, Abbott *et al.*, 2022 demonstraram a influência do tempo e da temperatura de secagem primária da liofilização para fabricação de *scaffolds* porosos. Foram testadas quatro soluções diferentes, variando a concentração de água/volume de solução em 3, 6, 9 e 12%, usando três protocolos distintos, o Long Hold, Slow Ramp e Standard (gráficos de temperatura e tempo para cada protocolo demonstrados na Figura 4). Os protocolos Long Hold e Slow Ramp resultaram em *scaffolds* para todas as concentrações, enquanto que o Standard não funcionou tão bem para as concentrações de 9 e 12%. A fim de investigar a utilização dos diferentes *scaffolds*, uma célula viva da linha HepaRG foi cultivada nos *scaffolds* de todas as concentrações feitas pelo protocolo Long Hold. Inicialmente os *scaffolds* de cada concentração mostraram variações em relação ao acúmulo de lipídios, crescimento celular e atividade metabólica, mas a partir do vigésimo oitavo dia de cultura essas diferenças não foram mais observadas. Foi possível concluir que ao modificar os parâmetros da secagem primária e a concentração das soluções é possível obter *scaffolds* liofilizados com propriedades adequadas para o uso na engenharia de tecidos.

Figura 4. Protocolos de liofilização utilizados para produção de *scaffolds*.



Fonte: Adaptado de Abbott *et al.*, 2022.

Enrione *et al.* (2017) também utilizaram a técnica de liofilização para a produção de *scaffolds* porosos. Foram criadas quatro soluções poliméricas: todas contendo gelatina de

salmão e alginato de sódio; duas com ágar; duas com agarose; e uma em cada um desses dois grupos com glicerol. As concentrações de cada componente não foram variadas. Esses *scaffolds* foram testados para cultivo da linha de celular de mioblastos C2C12. O *scaffold* mais promissor foi aquele com a formulação contendo gelatina de salmão, alginato de sódio, agarose e glicerol. O tamanho de poros obtido para esse *scaffold* foi em torno de 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, a biocompatibilidade e adesão das células de mioblastos foi em torno de 40% e eles levaram em torno de 24 horas para duplicar, essa foi a taxa de crescimento. O perfil de biodegradação dos *scaffolds* foi menor do que 25% depois de quatro semanas; em adicional, eles tiveram resposta miogênica adequada, alta proliferação e viabilidade celular, e distribuição celular adequada.

#### 5.4 CULTURAS DINÂMICAS

A cultura dinâmica em biorreatores envolve a criação de um ambiente controlado em um biorreator, onde microrganismos, células ou organismos são cultivados em condições que imitam as flutuações naturais que ocorrem em seu ambiente nativo. A cultura dinâmica é uma alternativa valiosa à cultura estática, pois permite simular condições mais próximas das encontradas na natureza, resultando em um crescimento celular mais saudável e uma produção mais eficiente de compostos desejados. Este método envolve a variação de parâmetros como a agitação, aeração, temperatura e a concentração de nutrientes ao longo do tempo, em resposta às necessidades das células cultivadas (Yeatts & Fisher, 2011).

Um exemplo de células que podem ser cultivadas em culturas dinâmicas são os micro carreadores. Micro carreadores são feitos a partir do crescimento de células aderentes em pequenas partículas em suspensão (Van Wezel *et al.*, 1967). Os micro carreadores são feitos principalmente de poliestireno, dextrano reticulado, celulose, gelatina ou ácido poligalacturônico (PGA), revestidos com colágeno ou peptídeos contendo adesão ou cargas positivas para promover a adesão celular. O diâmetro de um micro portador fica entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  (Bodiou *et al.*, 2020). Em seu estudo, Bodiou *et al.* (2020) descrevem tecnologias já existentes para a produção de micro portadores e como elas podem ser adaptadas para o uso como *scaffold* de carne cultivada. Foram levantadas três possibilidades de utilização dos micro carreadores. A primeira seria como um transportador temporário, visando dar suporte para a proliferação celular e sendo removidos antes do processamento. Na segunda, o micro carreador temporário é dissolvido ou degradado para liberar as células. E por fim, na terceira, os micro carreadores agem como *scaffold* comestível que é incorporado ao produto final. Embora os

micro carreadores ofereçam uma solução relativamente simples para expandir células mamíferas em larga escala e necessitando pouco espaço, eles apresentam limitações em relação aos custos de dissociação e separação celular, custo dos próprios micro carreadores, densidades celulares máximas que podem ser alcançados, e impactos potenciais sobre as propriedades nutricionais e/ou organolépticas do produto final (Bomkamp *et al.*, 2021).

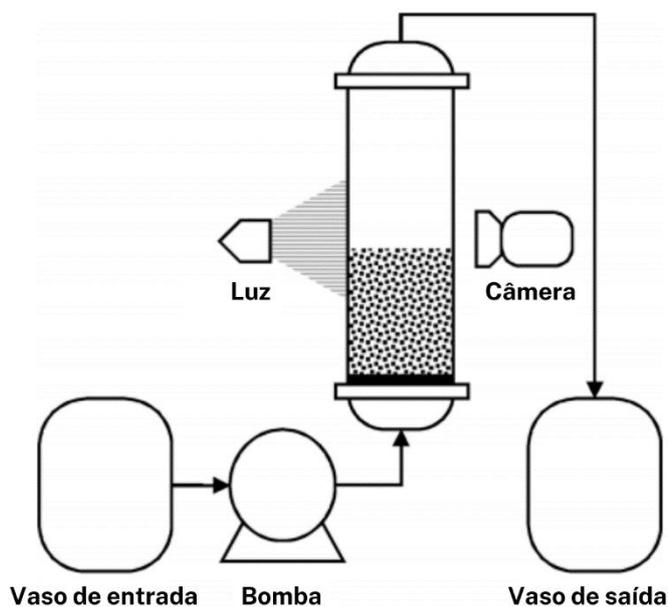
Biorreatores de agitação emergem como uma alternativa altamente eficaz para a ampliação em larga escala de células-tronco (Appelman *et al.*, 2011). O cultivo dinâmico dentro desses biorreatores oferece um ambiente hidrodinâmico que favorece o movimento fluido por todo o sistema, aprimorando o transporte de nutrientes e os estímulos mecânicos que impulsionam a produção da matriz extracelular. Além disso, é fundamental considerar com cautela a densidade e o método de semeadura celular, uma vez que a quantidade adequada de células é crucial para garantir interações celulares apropriadas, distribuição homogênea e penetração nos suportes estruturais. Diversos tipos de biorreatores permitem a aplicação de forças de compressão não confinadas e cisalhamento. Modelos como o biorreator de balão com agitação mecânica e o de parede rotativa são exemplos que foram projetados para aplicar diferentes intensidades de cisalhamento às estruturas de suporte celular. A circulação do fluido dentro dessas configurações gera forças de cisalhamento, que, conforme relatado por Darling & Athanasiou (2003) promovem a produção da matriz extracelular. Entre as abordagens de agitação mecânica, o frasco giratório se destaca como o mais comum e simples. Esse dispositivo possibilita a mistura eficaz de oxigênio e nutrientes em todo o meio, reduzindo a formação de gradientes de concentração na superfície das estruturas de suporte.

Um exemplo de aplicação de biorreator agitado é o estudo de Rodrigues *et al.* (2019), que visou expandir células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (hiPSCs) de maneira escalável. Tradicionalmente, essa expansão utiliza micro carreadores de poliestireno, os quais devem ser separados da cultura celular, levando à perda de células viáveis. No entanto, Rodrigues *et al.* (2019), exploraram o uso de micro carreadores solúveis, eliminando a necessidade de remoção subsequente. A cultura de hiPSCs foi conduzida em um ambiente dinâmico empregando frascos giratórios. A recuperação celular ocorreu dentro do próprio frasco, obtendo um rendimento de 92,4%, substancialmente superior ao método convencional de filtração (45,3%). Além disso, as células expandidas mantiveram sua capacidade de pluripotência e diferenciação em várias linhagens celulares. Os resultados destacaram o aprimoramento do processo de expansão de hiPSCs com base em micro carreadores, conduzindo a um processo biotecnológico mais eficiente e econômico.

O biorreator de leito fluidizado é um sistema de perfusão caracterizado pelo contínuo fluxo ascendente de fluido em torno de partículas, células ou células imobilizadas, permitindo que elas se comportem como um fluido. Este tipo de reator tem atraído crescente interesse dentro da engenharia de tecidos, devido à sua capacidade de expandir o leito de forma homogênea, suas excelentes propriedades de transferência de massa e sua adaptabilidade para aplicações em larga escala (Ellis *et al.*, 2005). Uma das vantagens do biorreator de leito fluidizado é a perfusão contínua do meio, eliminando os ciclos de alimentação típicos das culturas de células estáticas e descontínuas. Essa abordagem teoricamente permite alcançar densidades celulares mais elevadas, garantindo uma reposição constante de nutrientes. No entanto, é importante considerar que o aumento da turbulência para melhorar a transferência de massa também pode resultar em danos celulares e mortalidade devido às forças de cisalhamento resultantes (Sarker *et al.*, 2017; Varley & Birch, 1999). Diferenciando-se dos reatores de tanque com agitação contínua e reatores de bolsa, comumente empregados na indústria para culturas de células em grande escala, os biorreatores de leito fluidizado revelam-se particularmente eficientes no cultivo de células sensíveis ao estresse de cisalhamento, como células mamíferas (Kretzmer & Shugerl, 1991). A mistura eficaz do meio sem a necessidade de agitação mecânica, impelidores ou aeração representa uma característica valiosa que simplifica a construção do biorreator, reduz os custos de manutenção e de operação. Apesar de ainda serem realizadas culturas 2D em frascos estáticos ou placas em laboratórios, a produção em larga escala com base em superfícies planas é ineficiente. Para superar a limitação de superfície para células aderentes, o encapsulamento em grânulos de gel, utilizando uma matriz adequada ou semeando em micro carreadores 3D, têm sido amplamente adotado. Essa abordagem proporciona uma maior proporção de área/volume para as células se fixarem e realizarem a transferência de massa, ao mesmo tempo em que reduz o espaço necessário para o cultivo celular em biorreatores. Adicionalmente, o encapsulamento oferece uma camada protetora para as células. A resistência dos grânulos de gel é uma característica crítica, podendo ser ajustada para minimizar a ruptura ou perda de células da matriz. Essas esferas de gel devem ser suficientemente robustas para suportar a abrasão e compressão geradas pelo contato entre partículas (Hofman & Anne, 2006). Ao operar o biorreator em condições de fluidização, é essencial aplicar uma velocidade superficial superior à velocidade mínima de fluidização, onde o leito de partículas começa a se expandir, mas inferior à velocidade terminal, na qual as partículas são expulsas do sistema. Para garantir a eficiência do projeto do biorreator de leito fluidizado em aplicações na engenharia de tecidos, é fundamental caracterizar o comportamento

de expansão do leito de partículas. A Figura 5 traz um esquema de um sistema de biorreator de leito fluidizado.

Figura 5. Sistema de biorreator de leito fluidizado.



Fonte: Adaptado de Lucena-Thomas *et al.* (2020).

Lucena-Thomas *et al.* (2020) caracterizam em sua pesquisa a expansão do leito de partículas como células únicas, esferóides e microesferas de gel, em um biorreator de leito fluidizado. Para o cultivo de células únicas foram utilizadas células promieloblásticas humanas HL-60 (ATCC) e células de carcinoma hepatocelular humano C3A (C3A, ATCC), os esferóides foram criados usando o sistema Sphericalplate 5D (Kugelmeiers), de acordo com as instruções do fabricante, e as microesferas de gel, material de interesse para a carne cultivada, foram preparadas por meio de um sistema de eletrospray, conforme descrito por (Park *et al.*, 2012), usando uma solução de alginato a 2% p/v ou uma solução de alginato oxidado a 2% p/v. Eles mediram a distribuição do tamanho de partículas de cada material, determinaram sua velocidade terminal e suas características de expansão do leito. As velocidades obtidas, quando comparadas com os valores previstos pelas equações de Turton & Clark e Dallavalle (Khan & Richardson, 1988; Turton & Clark, 1987), apresentaram grandes desvios. Os dados de expansão do leito foram relatados com a equação de Richardson & Zaki (Richardson & Zaki, 1954). No entanto, os parâmetros previstos para esta equação também apresentaram desvios dos valores experimentais, provavelmente devido às perdas de energia cinética de colisões inelásticas de

partículas moles. Em adicional, as equações de Happel (Happel, 1958; Seibert & Burns, 1996), e Foscolo (Foscolo *et al.*, 1983) foram testadas, mas ambas mostraram desvios ainda maiores. Por fim, a equação de Richardson & Zaki, ajustada com  $n$  experimental e  $u_{t,\infty}$  foi proposta como modelo ideal para projeto e operação de biorreator de leiteo fluidizado. Esse estudo destaca a importância de usar os dados experimentais na expansão do leiteo.

## 5.5 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é um método simples, barato e já utilizado em diversos ramos industriais, tais como indústria têxtil, nanotecnologia e engenharia de tecidos. Os produtos gerados pela eletrofiação podem ser feitos em escala industrial, porém, embora seja versátil e com potencial para produção em larga escala, sua aplicação em sistemas alimentares ainda não é muito pesquisada (Levi *et al.*, 2022).

O processo de eletrofiação usa a força eletroestática para esticar gotículas de um polímero em solução até o seu ponto de potencial, formando uma estrutura chamada de cone de Taylor. Ao atingir um valor crítico, acima da tensão da superfície da gotícula, um jato da solução de polímero é liberado, se diluindo ao mesmo tempo que o solvente evapora, formando fibras sólidas submicrométricas ou nanométricas, sendo continuamente depositado em um coletor aterrado. Os filamentos produzidos podem variar em tamanho e micro estrutura para caber na aplicação desejada. Esse ajuste pode ser feito dependendo do polímero, escolhido, solventes, fatores ambientais como temperatura e umidade e parâmetros de processo (Mendes *et al.*, 2017).

*Scaffolds* fibrosos são feitos a partir de técnicas de fiação, como eletrofiação, pois elas podem ser usadas para produção de nanofibras com uma variedade de propriedades úteis para carne cultivada. Algumas dessas propriedades são a capacidade de suportar a adesão celular, realizar a difusão de oxigênio e nutrientes, e a capacidade de produzir fibras alinhadas que podem ajudar a promover a maturação da fibra no músculo. Alguns dos materiais que podem ser utilizados nas técnicas de fiação incluem ácido polilático (PLA) (Luo *et al.*, 2018; Badrossamay *et al.*, 2010), poli(ácido co-glicólico láctico) (PLGA) (Shin *et al.*, 2015; Aviss *et al.*, 2010), poli-caprolactona (PCL) (Tzezana *et al.*, 2008), gelatina metacrilóil (GelMA) (Ebrahimi *et al.*, 2018), fibronectina (Chantre *et al.*, 2018), albumina (Nseir *et al.*, 2013) e gelatina (MacQueen *et al.*, 2019). Combinações de materiais também são comuns, e podem melhorar as propriedades do *scaffold*.

Para aplicação em estruturação de células, *scaffolds*, os poros nano fibrosos produzidos imitam a morfologia e estrutura de tecidos da matriz extracelular e possuem grande área de superfície, ideal para adesão e proliferação. De acordo com estudos, foi mostrado que uma variedade de células conseguem se aderir nos poros feitos por eletrofiação, com a ME, gelatina e zeína (Schoen *et al.*, 2017).

A orientação das fibras eletrofiadas pode ser ajustada para controlar a morfologia das células cultivadas no *scaffold*. Por exemplo, as fibras eletrofiadas podem ser alinhadas, o que induz o alinhamento das células semeadas e promove o alongamento das células musculares, assim como a miogênese (Uehara *et al.*, 2020). As soluções poliméricas carregadas de células podem ser eletrofiadas, e o micropadrão dos filamentos eletrofiados pode guiar o crescimento das células, resultando em uma distribuição homogênea das células e maior acessibilidade de nutrientes em todo o *scaffold* (Yeo & Kimy, 2018).

A eletrofiação de diversos biopolímeros comestíveis, como gelatina, whey protein, quitosana, zeína, celulose, amido, soja e albumina, já foram estabelecidas por diferentes estudos (Levi *et al.*, 2022). Mesmo sendo uma tecnologia promissora visando a produção em larga escala, para produzir *scaffolds* para carne cultivada utilizando eletrofiação alguns desafios precisam ser superados.

Um dos principais desafios é a necessidade de utilização de solventes não comestíveis, flúor-álcoois como hexafluoroisopropanol e 2,2,2-trifluoroetanol, que desnaturam proteínas e fornecem propriedades visco elásticas, permitindo a formação de fibras durante a eletrofiação. Esses solventes possuem alta taxa de evaporação e desnaturam parcialmente biopolímeros feitos por eletrofiação, quebrando interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Levi *et al.*, 2022). São considerados tóxicos e não seguros para alimentos, pois mesmo que sejam rapidamente evaporados podem deixar resíduos. Como alternativa para a eletrofiação de biopolímeros comestíveis, pode ser feito o uso de soluções aquosas de alta força iônica ou solventes benignos, como etanol (Mattice & Marangoni, 2020), ácido fórmico ou ácido acético (Deng *et al.*, 2018) que são classificados como solventes de Classe 3 pelo FDA, são considerados menos tóxicos e de menor risco para o ser humano e podem ser incluídos nos alimentos em quantidades limitadas por boas práticas de fabricação.

Outra solução é a adição de polímeros transportadores, que aumentam a capacidade de fiação da solução de eletrofiação melhorando suas propriedades visco elásticas (Leidy & Ximena, 2019). Eles devem ser degradáveis no sistema digestivo humano, e a concentração tanto do polímero quanto de seus produtos de degradação não deve ser tóxica, conforme

determinado por autoridades como FDA. Alguns polímeros usados como polímeros transportadores na eletrofição de biomateriais comestíveis são poli óxido de etileno (Schoen *et al.*, 2017), poli álcool vinílico, policaprolactona (Zadeh & Hosseini, 2019) e ácido polilático. Dentre esses polímeros, apenas o PVA e o PEO são aprovados pelo FDA como aditivos indiretos de alimentos. Além disso, esses polímeros sintéticos não fornecem benefícios nutricionais e não suportam a adesão celular, essencial para *scaffolds* celulares (Donnaloja *et al.*, 2020). Portanto, esses polímeros sintéticos não são desejáveis para consumo direto e uma alternativa deve ser buscada para o desenvolvimento de *scaffolds* de carne cultivada (Donnaloja *et al.*, 2020).

Em adicional, as mantas eletrofiadas podem sofrer modificações pós-processamento, como reticulação química ou física para melhorar suas propriedades mecânicas. Alguns dos reticuladores de proteínas que geralmente são usados, são considerados tóxicos, incluindo formaldeído (Glusac & Fishman, 2021). Portanto, esses reticuladores devem ser evitados em aplicações alimentícias. Reticuladores não tóxicos, enzimas de reticulação ou modos físicos de reticulação usando pH ou temperatura podem ser usados em vez disso, para obter *scaffolds* de propriedades mecânicas superiores (Glusac & Fishman, 2021).

Narayanan *et al.* (2020) demonstraram a fabricação de um *scaffold* reticulado de polissacarídeos de quitina-glucana, feito de fungos e utilizando eletrofição. Os fungos são um grupo de eucariotos, eles possuem paredes celulares compostas de quitina, altamente ramificadas de hifas, e crescem como estruturas rígidas, muito semelhante as micro e nanofibras feitas por meio de eletrofição (Bernard & Latgé, 2001). Ainda sobre as paredes celulares dos fungos filamentosos, elas são constituídas por diversas estruturas lineares e polissacarídeos ramificados, bem como proteínas modificadas após a tradução e lipídios. Essa organização micelial em forma de filamentos oferece resistência mecânica e promove interações com os elementos do hospedeiro (Arana *et al.*, 2009), o que justifica a utilização desses biomateriais para a construção de *scaffolds*. O solvente utilizado foi o  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) e os resultados obtidos mostraram uma melhora na hemocompatibilidade e na biocompatibilidade, uma vez que o BME conferiu ao *scaffold* feito de fungo adesão e proliferação de queratinócitos humanos.

Outro exemplo de *scaffold* feito à base de plantas é o desenvolvido por Ahn *et al.* (2018). Feito de proteína de soja hidrolisada e acetato de celulose, por meio de eletrofição à jato, ele foi criado para uso na cicatrização de feridas. A proteína de soja tem peptídeos bioativos similares as proteínas que compõem a matriz extracelular, o que promove adesão celular,

proliferação e, ainda, migração para regeneração de tecidos (Tokudome *et al.*, 2012). A utilização de *scaffolds* nano fibrosos surgiu como uma abordagem para a cicatrização (Hassiba *et al.*, 2016) com base na sua capacidade de replicar o microambiente fibroso dérmico da ME, que fornece suporte estrutural para a cicatrização de feridas e regeneração tecidual (Boateng *et al.*, 2008). O acetato de celulose foi utilizado como polímero transportador, o que aumentou a proliferação, o crescimento, a migração e a infiltração de fibroblastos; em adicional, também mostrou menor citotoxicidade quando comparado com as nanofibras feitas de polímero policaprolactona ou somente de acetato de celulose.

## 5.6 ABORDAGENS LIVRES DE SCAFFOLDS

Embora os *scaffolds* forneçam muitas vantagens para a engenharia de tecidos, como a capacidade de facilitar o transporte de oxigênio e nutrientes e o controle preciso sobre a geometria 3D da construção final, os métodos sem *scaffolds* também podem resolver esses desafios. A combinação de várias células planares é um dos métodos que pode ser utilizado para fabricação de carne cultivada livre de *scaffold*. Neste caso, como não há uso de biotintas e *scaffolds*, as células são mantidas juntas a partir de sua própria matriz extracelular secretada. Em seu estudo, Shahin-Shamsabadi & Selvaganapathy (2020) utilizaram o método  $\pi$ -SACS, baseado em uma mudança de pH para desencadear a delaminação de uma folha de célula, que posteriormente é empilhada juntamente com outras folhas, para formar células de mioblastos C2C12. Este método também foi recentemente explorado por Shahin-Shamsabadi & Selvaganapathy (2022) para uso na carne cultivada, a partir de uma combinação de células musculares e adipócitos. Os desafios do método  $\pi$ -SACS incluem o espaço necessário para crescimento celular em cultura 2D, bem como a natureza trabalhosa de empilhar várias folhas. A fim de resolver essas problemáticas, novas geometrias de biorreatores e métodos automatizados para montagem de tecidos devem ser estudados (Shahin-Shamsabadi & Selvaganapathy, 2020).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para a produção e comercialização da carne cultivada ser viável, faz-se necessário o uso de matérias primas seguras, sustentáveis e que podem ser utilizadas em larga escala (Murphy & Atala, 2014). O primeiro hambúrguer feito de carne cultivada foi apresentado em 2013, pelo

professor Mark Post. Pesando 85g, o hambúrguer custou em torno de 200 mil dólares. Desde então, inúmeras empresas estão investindo em pesquisa para tornar a carne cultivada acessível e escalável. Em 2019, esse mesmo hambúrguer já estava custando algo em torno de nove euros (The Good Food Institute, 2022). Além disso, as matérias primas devem cumprir as diretrizes de segurança de alimentos determinadas pelas autoridades como a *Food and Drug Administration* (FDA). Visando também a sustentabilidade, os insumos para a produção também precisam ser sustentáveis. Matérias primas animais como soro fetal bovino são utilizados para estudos e testes, mas não devem ser aplicados para a fabricação de carne cultivada em grande escala (Post *et al.*, 2020). O biomaterial escolhido deve suportar a cultura de células e possuir estrutura mecânica e bioquímica para guiar a ligação entre as células, sua morfologia, proliferação e outras atividades celulares. O biomaterial também precisa suportar a diferenciação celular de células relacionadas com a carne, como miócitos, adipócitos ou fibroblastos (Post *et al.*, 2020). A viabilidade tecnológica, é ditada pela compatibilidade de um determinado biomaterial com a tecnologia de fabricação desejada (Singh *et al.*, 2022).

Biomateriais que podem ser alergênicos, tais como a soja e o amendoim, devem ser devidamente especificados na rotulagem. Alguns biomateriais sugeridos como *scaffoldings* são proteínas como colágeno, gelatina e fibrinogênio, e polissacarídeos (Post *et al.*, 2020). O colágeno, a gelatina e o fibrinogênio são naturalmente abundantes na matriz extracelular dos tecidos animais e oferecem boa aderência celular e crescimento, além de acrescentarem valor nutricional. Porém, por serem de origem animal, essas proteínas são menos aceitáveis em termos de sustentabilidade e bem-estar animal. Uma maneira de contornar essa problemática pode ser as novas tecnologias que produzem proteínas recombinantes por meio de plantas e fungos (Ng & Kurisawa, 2021).

Até agora, os biomateriais propostos para carne cultivada atendem a todas ou parte das considerações acima mencionadas. Além disso, diversos *scaffolds* de carne cultivada dependem de modificações de biomateriais, fontes prospectivas de biomateriais ou capacidades tecnológicas futuras para facilitar tal conformidade. Os biomateriais de *scaffolds* sugeridos para carne cultivada incluem vários tipos de proteínas e polissacarídeos (Bomkamp *et al.*, 2022). Proteínas de origem vegetal, como proteínas isoladas da soja, trigo, aveia, algodão, amendoim e ervilha são boas opções devido ao seu baixo custo, alto valor nutricional, grande conhecimento em relação ao seu processamento e aceitabilidade do consumidor. Essas proteínas são consideradas biomateriais promissores para a produção de carne cultivada, porém, sua adesão celular insuficiente pode exigir modificações (Cai *et al.*, 2020).

Os polissacarídeos propostos como *scaffolds* de carne cultivada precisam suportar a adesão das células e sua proliferação. Um exemplo de polissacarídeo que pode ser utilizado é quitosana, pois ela tem citocompatibilidade, é comestível, de baixo custo e acessível. É extraída de resíduos biológicos marinhos, e por ter origem animal seu uso é limitado. Outros polissacarídeos de origem vegetal, como alginato, pectina, celulose e amido são também aceitáveis (Ng & Kurisawa, 2021). Ainda, os biomateriais escolhidos para produção da carne cultivada devem contribuir para a aparência, gosto, textura e valor nutricional da carne de origem animal. Sendo assim, o progresso das pesquisas relacionadas ao uso de *scaffolds* para carne cultivada ainda está em andamento, e a otimização contínua das estratégias é essencial para garantir a compatibilidade das células desejadas e a aplicabilidade em espécies relevantes para a agricultura celular.

## REFERÊNCIAS

Abbott, A; Gravina, M; Vandadi, M; Rahbar, N; Coburn, J. Influence of lyophilization primary drying time and temperature on porous silk scaffold fabrication for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 111, p. 118-131, 2023.

Agrawal, L; Vimal, S. K; Barzaghi, P; Shiga, T; Terenzio, M. Biodegradable and Electrically Conductive Melanin-Poly(3-Hydroxybutyrate) 3D Fibrous Scaffolds for Neural Tissue Engineering Applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 22, 2022.

Ahmad, K; Lim, J. H.; Lee, E. J.; Chun, H. J.; Ali, S.; Ahmad, S. S.; Shaik, S.; Choi, I. “Extracellular Matrix and the Production of Cultured Meat”. **Foods**, v. 10, 2022.

Ahmed, S; Chauhan, V. M; Ghaemmaghami, A. M; Aylott, J. M. New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. **Biotechnology Letters**, v. 41, p. 01-25, 2019.

Ahn, S; Chantre, C; Gannon, A; Lind, J; Campbell, P; Grevesse, T; O'Connor, B; Parker, K. Soy Protein/Cellulose Nanofiber Scaffolds Mimicking Skin Extracellular Matrix for Enhanced Wound Healing. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, 2018.

Aisenbrey, E. A. & Murphy, W. L. Synthetic alternatives to Matrigel. **Nature Reviews Materials**, v. 5, p. 539-551, 2020.

Akers, M. Basic Principles of Lyophilization, Part 1. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 19, p. 471-476, 2015.

Akers, M. Basic Principles of Lyophilization, Part 2. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20, p. 20-27, 2016.

Allan, S. J; De Bank, P. A; Ellis, M. J. Bioprocess Design Considerations for Cultured Meat Production With a Focus on the Expansion Bioreactor. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019.

An, C; Chen, Y; Wu, Y; Hu, Z; Zhang, H; Liu, R; Zhou, Y; Cen, L. Manipulation of porous poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) microcarriers via microfluidics for C2C12 expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, 2023.

Andriotis, E. G; Eleftheriadis, G. K; Karavasili, C; Fatouros, D. G. Development of Bio-Active Patches Based on Pectin for the Treatment of Ulcers and Wounds Using 3D - Bioprinting Technology. **Pharmaceutics**, v. 12, 2020.

Appelman, T. P; Mizrahi, J; Elisseeff, J. H; Seliktar, D. The influence of biological motifs and dynamic mechanical stimulation in hydrogel scaffold systems on the phenotype of chondrocytes. **Biomaterials**, v. 6, p. 1508-1516, 2011.

Arana, D; Prieto, D; Román, E; Nombela, C; Alonso-Monge, R; Pla, J. The role of the cell wall in fungal pathogenesis. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 308-320, 2009.

Arsiccio, A; Barresi, A; Pisano, R. Prediction of Ice Crystal Size Distribution after Freezing of Pharmaceutical Solutions. **Crystal Growth & Design**, v. 17, p. 4573-4581, 2017.

Averianov, I; Stepanova, M; Solomakha, O; Gofman, I; Serdobintsev, M; Blum, N; Kaftuirev, A; Baulin, I; Nashchekina, J; Lavrentieva, A; Vinogradova, T; Korzhikov-Vlakh, V; Korzhikova-Vlakh, E. 3D-Printed composite scaffolds based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) filled with poly(glutamic acid)-modified cellulose nanocrystals for improved bone tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 110, p. 2422-2437, 2022.

Aviss, K; Gough, J; Downes, S. Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. **European Cells & Materials**, v. 19, p. 193-204, 2010.

Axpe, E; Oyen, M. L. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.

Badrossamay, M; McIlwee, H; Goss, J; Parker, K. Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. **Nano Letters**, v. 10, p. 2257-2261, 2010.

Bau, H; Zhong, J; Yi, M. A minute magneto hydro dynamic (MHD) mixer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 79, p. 207-215, 2001.

Bellet, C.; Rushton, J. “World food security, globalisation and animal farming: Unlocking dominant paradigms of animal health science”. **Revue Scientifique et Technique**, v. 38, p. 383-392, 2019.

Ben-Arye, T. & Levenberg, S. Tissue Engineering for Clean Meat Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019

Bernard, M; Latgé, J. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Medical mycology**, v. 39, p. 9-17, 2001.

Bhat, Z. F; Kumar, S; Bhat, H. F. “In vitro meat: A future animal-free harvest”. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 782-789, 2017.

Bhat, Z.F.; Fayaz, H. “Prospectus of cultured meat—Advancing meat alternatives”. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 125-140, 2010.

Boateng, J; Matthews, K; Stevens, H; Eccleston, G. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2892-2923, 2008.

Bodiou, V; Moutsatsou, P; Post, M. Microcarriers for Upscaling Cultured Meat Production. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2020.

Bomkamp, C.; Skaalure, S. C.; Fernando, G. F.; Ben-Ayre, T.; Swartz, E. W.; Specht, E. A. “Scaffolding Biomaterials for 3D Cultivated Meat: Prospects and Challenges”. **Advanced Science**, v. 9, 2021.

Cai, S; Wu, C; Yang, W; Liang, W; Yu, H; Liu, L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. **Nanotechnology Reviews**, v. 9, p. 971-989, 2020.

Campuzano, S. & Pelling, A. E. Scaffolds for 3D Cell Culture and Cellular Agriculture Applications Derived From Non-animal Sources. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019.

Chantre, C. O; Campbell, P. H; Golecki, H. M; Buganza, A. T; Capulli, A. K; Deravi, L. F; Dauth, S; Sheepy, S. P; Paten, J. A; Gledhill, K; Doucet, Y. S; Abaci, H. E; Ahn, S; Pope, B. D; Ruberti, J. W; Hoerstrup, S. P; Christiano, A. M; Parker, K. K. Production-scale fibronectin nanofibers promote wound closure and tissue repair in a dermal mouse model. **Biomaterials**, v. 166, p. 96-108, 2018.

Chen, H; Zhong, J; Wang, J; Huang, R; Qiao, X; Wang, H; Tan, Z. Enhanced growth and differentiation of myoblast cells grown on E-jet 3D printed platforms. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 937-950, 2019.

Chen, L; Guttieres, D; Koenigsberg, A; Barone, P. W.; Sinskey, A. J.; Springs, S. L. “Large-scale cultured meat production: Trends, challenges and promising biomanufacturing technologies”. **Biomaterials**, v. 280, 2022.

Chen, X; Yan, H; Bao, C; Zhu, Q; Liu, Z; Wen, Y; Li, Z; Zhang, T; Lin, Q. Fabrication and evaluation of homogeneous alginate/polyacrylamide-chitosan-gelatin composite hydrogel scaffolds based on the interpenetrating networks for tissue engineering. **Polymer Engineering and Science**, v. 62, p. 116-128, 2021.

Chien, K. B; Makridakis, E; Shah, R. N. Three-Dimensional Printing of Soy Protein for Scaffolds for Tissue Regeneration. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, 2012.

Chiesa, E; Dorati, R; Pisani, S; Conti, B; Bergamini, G; Modena, T; Genta, I. The microfluidic technique and the manufacturing of polysaccharide nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 10, 2018.

Choi, K. H; Yoon, J. W; Kim, M; Lee, H. J; Jeong, J; Ryu, M; Jo, C; Lee, C. Y. Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, p. 429-457, 2020.

Corcione, C. E; Gervaso, F; Scalera, F; Padmanabhan, S. K; Madaghiele, M; Montagna, F; Sannino, A; Licciulli, A; Maffezzoli, A. Highly loaded hydroxyapatite microsphere/PLA porous scaffolds obtained by fused deposition modelling. **Ceramics International**, v. 45, p. 2803-2810, 2019.

Cui, X; Li, J; Hartanto, Y; Durham, M; Tang, J; Zhang, H; Hooper, G; Lim, K; Woodfield, T. Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, 2020.

Darling, E. M. & Athanasiou, K. A. Articular cartilage bioreactors and bioprocesses. **Tissue Engineering**, v. 9, p. 9-26, 2003.

Das, A. K. & Gavel, P. K. Low molecular weight self-assembling peptide-based materials for cell cultura, antimicrobial, anti-inflammatory, wound healing, anticancer, drug delivery, bioimaging and 3D bioprinting applications. **Soft Matter**, v. 16, p. 10065-10095, 2020.

Das, S; Browne, K. D; Laimo, F. A; Maggiore, J. C; Hilman, M. C; Kaisaier, H; Aguilar, C. A; Ali, Z. S; Mourkioti, F; Cullen, D. K. Pre-innervated tissue-engineered muscle promotes a pro-regenerativa microenvironment following volumetric muscle loss. **Communications Biology**, v. 3, 2020.

Deng, L; Kang, X; Liu, Y; Feng, F; Zhang, H. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospining vs solvent casting. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 324-332, 2018.

Djusalov, M; Knežić, T; Podunavac, I; Živojević, K; Radonic, V; Knežević, N. Ž; Bobrinetskiy, I; Gadjanski, I. Cultivating Multidisciplinarity: Manufacturing and Sensing Challenges in Cultured Meat Production. **Biology**, 2021.

Donnaloja, F; Jacchetti, E; Soncini, M; Raimondi, M. T; Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. **Polymers**, v. 12, 2020.

Ebrahimi, M; Ostrovidov, S; Salehi, S; Kim, S. B; Bae, H; Khademhosseini, A. Enhanced skeletal muscle formation on microfluidic spun gelatin methacryloyl (GelMA) fibres using surface patterning and agrin treatment. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, p. 2151-2163, 2018.

Ellis, M; Chaudhuri, J. Poly(lactic-co-glycolic acid) hollow fibre membranes for use as a tissue engineering scaffold. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 177-187, 2007.

Ellis, M; Jarman-Smith, J; Chaudhuri, J. B. Bioreactor systems for tissue engineering: A four-dimensional challenge. **Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation**, p. 1-18, 2005.

Enrione, J; Blaker, J; Brown, D; Weinstein-Oppenheimer, C; Pepczynska, M; Olguín, Y; Sánchez, E; Acevedo, C. Edible scaffolds based on non-mammalian biopolymers for myoblast growth. **Materials**, v. 10, 2017.

Estudo Regulatório sobre Proteínas Alternativas no Brasil - Carne Cultivada. The Good Food Institute Brasil. São Paulo: The Good Food Institute, 2022.

Fan, M; Qiang, L; Wang, Y; Liu, Y; Zhuang, H; Guo, R; Ben, Y; Li, Q; Zheng, P. 3D bioprinted hydrogel/polymer scaffold with factor delivery and mechanical support for growth plate injury repair. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.

FAO. **News Article: Major Cuts of Green House Gas Emission from Livestock within Reach**; FAO: Rome, Italy, 2022; Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/197608/icode> Acesso em: 26 de Novembro de 2022.

Fish, K. D; Rubio, N. R; Stout, A. J; Yuen, J. S. K; Kaplan, D. L. Prospects and challenges for cell-cultured fat as a novel food ingredient. **Trends in Food Science & Technology**, v. 98, p. 53-67, 2020.

Foerst, P; Melo de Carvalho, T; Lechner, M; Kovacevic, T; Kim, S; Kirse, C; Briesen, H. Estimation of mass transfer rate and primary drying times during freeze-drying of frozen maltodextrin solutions based on x-ray  $\mu$ -computed tomography measurements of pore size distributions. **Journal of Food Engineering**, v. 260, p. 50-57, 2019.

Foerst, P; Melo, T; Lechner, M; Kovacevic, T; Kim, S; Kirse, C; Briesen, H. Estimation of mass transfer rate and primary drying times during freeze-drying of frozen maltodextrin solutions based on x-ray  $\mu$ -computed tomography measurements of pore size distributions. **Journal of Food Engineering**, v. 260, p. 50-57, 2019.

Foscolo, P. U; Gibilaro, L. G; Waldram, S. P. A unified model for particulate expansion of fluidised beds and flow in fixed porous media. **Chemical Engineering Science**, v. 38, p. 1251-1260, 1983.

Freeman, F. E; Kelly, D. J. Tuning Alginate Bioink Stiffness and Composition for Controlled Growth Factor Delivery and to Spatially Direct MSC Fate within Bioprinted Tissues. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

Furihashi, M; Morimoto, Y; Shima, A; Nakamura, F; Ishikawa, H; Takeuchi, S. **Npj Science of Food**, v. 5, 2021.

Gershlak, J. R; Hernandez, S; Fontana, G; Perreault, L. R; Hansen, K. J; Larson, S. A; Binder, B. Y. K; Dolivo, D. M; Yang, T; Dominko, T; Rolle, M. W; Weathers, P. J; Medina-Bolivar, F; Cramer, C. L; Murphy, W. L; Gaudette, G. R. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 125, p. 13-22, 2017.

Gholobova, D; Terrie, L; Gerard, T. M; Declerecq, H; Thorrez, L. Vascularization of tissue-engineered skeletal muscle constructs. **Biomaterials**, v. 235, 2020.

Gillies, A. R; Lieber, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, p. 318-331, 2011.

Glusac, J; Fishman, A. Enzymatic and chemical modification of zein for food application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 507-517, 2021.

Godfray, H. J. C; Aveyard P; Garnett T; Hall, J. W; Key, T. J; Lorimer, J; Pierrehumbert, R. T; Scarborough, P; Springmann, M; Jebb, S. A. Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. **Science**, v. 360, p. 987-988, 2018.

Goldman, J; More, H; Yee, O; Borgeson, E; Remy, B; Rowe, J; Sadineni, V. Optimization of Primary Drying in Lyophilization During Early-Phase Drug Development Using a Definitive Screening Design With Formulation and Process Factors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 2592-2600, 2018.

Greener, J; Li, W; Ren, J; Voicu, D; Pakharenko, V; Tang, T; Kumacheva, E. Rapid, cost-efficient fabrication of microfluidic reactors in thermoplastic polymers by combining photolithography and hot embossing. **Lab on a Chip**, v. 10, p. 522-524, 2010.

Grigoryan, B; Paulsen, S. J; Corbett, D. C; Sazer, D. W; Fortin, C. L; Zaita, A. J; Greenfield, P. T; Calafat, N. J; Gounley, J. P; Ta, A. H; Johansson, F; Randles, A; Rosenkrantz, J. E; Louis-Rosengberg, J. D; Galie, P. A; Stevens, K. R; Miller, J. S. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. **Science**, v. 364, n. 6439, p. 458-464, 2019.

Guerci, M; Bava, L; Zucali, M; Sandrucci, A; Penati, C; Tamburini, A. Effect of farming strategies on environmental impact of intensive dairy farms in Italy. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 300-308, 2013.

Guzelgulgen, M; Ozkendir-Inanc, D; Yildiz, U. H; Arslan-Yildiz, A. A. Glucuronoxylan-based quince seed hydrogel: A promising scaffold for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 729-738, 2021.

Hakobyan, D; Médina, C; Dusserre, N; Stachowicz, M. L; Handschin, C; Fricain, J. C; Guibert, J. G; Oliveira, H. Laser-assisted 3D bioprinting of exocrine pancreas spheroid models for cancer initiation study. **Biofabrication**, v. 12, 2020.

Handral, K; Hua Tay, S; Chan W; Choudhury, D. 3D Printing of cultured meat products. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 62, p. 272-281, 2022.

Happel, J. Viscous flow in multiparticle systems: Slow motion of fluids relative to beds of spherical particles. **AIChE Journal**, v. 4, p. 197-201, 1958.

Hassiba, A; El Zowalaty, M; Nasrallah, G; Webster, T; Luyt, A; Abdullah, A; Elzatahry, A. Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. **Nanomedicine**, v. 11, p. 715-737, 2016.

Hell, A. F; Simbara, M. M. O; Rodrigues, P; Kakazu, D. A; Malmonge, S. M. Production of fibrous polymer scaffolds for tissue engineering using an automated solution blow spinning system. **Research on Biomedical Engineering**, v. 34, p. 273-278, 2018.

Hewitt, C. J; Lee, K; Nienow, A. W; Thomas, R. J; Smith, M; Thomas, C. R. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarries. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 2325-2335, 2011.

Hickey, R. J; Modulevsky, D. J; Cuerrier C. M; Pelling A. E. Customizing the Shape and Microenvironment Biochemistry of Biocompatible Macroscopic Plant-Derived Cellulose Scaffolds. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, p. 3726-3736, 2018.

Hofman, M. & Anne, J. Applications of Cell Immobilisation Biotechnology. **Springer**, 2006

Hu, Y; Wang, J; Li, X; Zhou, W; Dong, X; Wang, C; Yang, Z; Binks, B. P. Facile preparation of bioactive nanoparticle/poly(e-caprolactone) hierarchical porous scaffolds via 3D printing of high internal phase Pickering emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 545, p. 104-115, 2019.

Izutsu, K. Applications of Freezing and Freeze-Drying in Pharmaceutical Formulations. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1081, p. 371-383, 2018.

Jones, J. D; Rebello, A. S; Gaudette, G. R. Decellularized Spinach: An Edible Scaffold for Laboratory-Grown Meat. **Food Bioscience**, 2021.

Kanematsu, A; Marui, A; Yamamoto, S; Ozeki, M; Hirano, Y; Yamamoto, M; Ogawa, O; Komeda, M; Tabata, Y. Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 281-292, 2004.

Kang, D; Louis, F; Liu, H; Shimoda, H; Nishiyama, Y; Nozawa, H; Kakitani, M; Takagi, D; Kara, D; Nagamori, E; Irie, S; Kitano, S; Matsusaki, M. Engineered whole cut meat-like tissue by the assembly of cell fibers using tendon-gel integrated bioprinting. **Nature Communications**, v. 12, 2021.

Kankala, R; Zhao, J; Liu, C; Song, X; Yang, D; Zhu, K; Wang, S; Zhang, Y; Chen A. Highly Porous Microcarriers for Minimally Invasive In Situ Skeletal Muscle Cell Delivery. **Small**, v. 15, 2019.

Khan, A. R. & Richardson, J. F. Fluid-particle interactions and flow characteristics of fluidized beds and settling suspensions of spherical particles. **Chemical Engineering Communications**, v. 78, p. 111-130, 1988.

Khoshnood, N; Shahrezayee, M. H; Shahrezayee, M; Shams, A; Zamanian, A. Biological study of polyethyleneimine functionalized polycaprolactone 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 39, 2022.

Kim, B; Hong, L; Chung, Y; Kim, D; Lee, C. Solvent-Resistant PDMS Microfluidic Devices with Hybrid Inorganic/Organic Polymer Coatings. **Advanced Functional Materials**, v. 19, p. 3796-3803, 2009.

Kim, J. H; Kim, I; Seol, Y. J; Ko, I. K; Yoo, J. J; Atala, A; Lee, S. J. Neural cell integration into 3D bioprinted skeletal muscle constructs accelerates restoration of muscle function. **Nature Communications**, v. 11, 2020.

Kong, Y; Toh, N. P; Wu, Y; Huang, D. Trypsin-treated chickpea protein hydrolysate enhances the cytoaffinity of microbeads for cultured meat application. **Food Research International**, v. 173, 2023.

Kretzmer, G. & Shugerl, K. Response of mammalian cells to shear stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 613-616, 1991.

Kucinska-Lipka, J; Gubanska, I; Pokrywczynska, M; Cieslinski, H; Filipowicz, M; Cieslinski, H; Filipowicz, N; Drewa, T; Janik, H. Polyurethane porous scaffolds (PPS) for soft tissue regenerative medicine applications. **Polymer Bulletin**, v. 75, p. 1957-1979, 2018.

Kwak, T; Nam, Y; Najera, M; Lee, S; Strickler, J; Chang, W. Convex Grooves in Staggered Herringbone Mixer Improve Mixing Efficiency of Laminar Flow in Microchannel. **Plos One**, v. 11, 2016.

Lai, C; Zhang, S. J; Wang, L. Q; Sheng, L. Y; Zhou, Q. Z; Xi, T. F. The relationship between microstructure and in vivo degradation of modified bacterial cellulose sponges. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 46, 2015.

Langelaan, M. L. P; Boonen, K. J. M; Rosaria-Chak, K. Y; Van der Schaft, W. J; Post, M. J; Baaijens, F. P. T. Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, p. 529-539, 2011.

Lanzoni, D.; Bracco, F.; Cheli, F.; Colosimo, B. M.; Moscatelli, D.; Baldi, A.; Rebutti, R.; Giromini, C. “Biotechnological and Technical Challenges Related to Cultured Meat Production”. **Applied Sciences**, v. 12, 2022.

Lee, J; Jung, H; Park, N; Park, S. H; Ju, J. H. Induced Osteogenesis in Plants Decellularized Scaffolds. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

Leidy, R; Ximena, Q. C. M. Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 92-106, 2019.

Lett, J. A; Sagadevan, S; Shahnavaz, Z; Latha, M. B; Alagarswamy, K; Hossain, M. A. M; Mohammad, F; Johan, M. R. Exploration of gum ghatti-modified porous scaffolds for bone tissue engineering applications. **New Journal of Chemistry**, v. 44, 2020.

Levenberg, S; Rouwkema, J; Macdonald, M; Garfein, E. S; Kohane, D. S; Darland, D. C; Marini, R; Van Blitterswijk, C. A; Mulligan, R. C; D'Amore, P. A; Langer, R. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 879-884, 2005.

Levi, S; Yen, F. C.; Baruch, L.; Machluf, M. “Scaffolding technologies for the engineering of cultured meat: Towards a safe, sustainable, and scalable production”. **Trends in Food Science & Technology**, v. 126, p. 13-25, 2022.

Levy-Mishali, M; Zoldan, J; Levenberg, S. Effect of scaffold stiffness on myoblast differentiation. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, p. 935-944, 2009.

Li, Y; Liu, W; Li, S; Zhang, M; Yang, F; Wang, S. Porcine skeletal muscle tissue fabrication for cultured meat production using three-dimensional bioprinting technology. **Journal of Future Foods**, v. 1, p. 88-97, 2021.

Listrat, A; Lebret, B; Louveau, I; Astruc, T; Bonnet, M; Lefaucheur, L; Picard, B; Bugeon, J. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flash Quality. **Scientific World Journal**, 2016.

Lodish, H; Berk, A; Zipursky, S. L; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnel, J. Photosynthetic Stages and Light-Absorbing Pigments. **Molecular Cell Biology**, v. 4, 2000.

Loh, Q; Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 6, p. 485-502, 2013.

Lu, Q; Zhu, H; Zhang, C; Zhang, B; Kaplan, D. Silk Self-Assembly Mechanisms and Control From Thermodynamics to Kinetics. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 826-832, 2012.

Lucena-Thomas, J; Boonprasirt, P; Luetchford, K; De Bank, P; Ellis, M. Bed expansion properties of tissue engineering particles in a fluidised bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 160, 2020.

Luo, B; Tian, L; Chen, N; Ramakrishna, S; Thakor, N; Yang, I. Electrospun nanofibers facilitate better alignment, differentiation, and long-term culture in an in vitro model of the neuromuscular junction (NMJ). **Biomaterials Science**, v. 12, 2018.

MacQueen, L; Alver, C; Chantre, C; Ahn, S; Cera, L; Gonzalez, G; O'Connor, B; Drennan, D; Peters, M; Motta, S; Zimmerman, J; Parker, K. Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs. **Npj Science of Food**, v. 3, 2019.

Mahendiran, B; Muthusamy, S; Sampath, S; Jaisankar, S. N; Popat, K. C; Selvakumar, R; Krishnakumar, G. S. Recent trends in natural polysaccharide based bioinks for multiscale 3D

printing in tissue regeneration: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 564-588, 2021.

Matai, I; Kaur, G; Seyedsalehi, A; McClinton, A; Laurencin, C, T. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. **Biomaterials**, v. 226, 2020.

Mattice, K, D; Marangoni, A, G. Comparing methods to produce fibrous material from zein. **Food Research International**, v. 128, 2020.

Mendes, A; Stephansen, K; Chronakis, I. Electrospinning of food proteins and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 53-68, 2017.

Miller, J. S. The Billion Cell Construct: Will Three-Dimensional Printing Get Us There?. **PLOS Biology**, v. 12, 2014.

Miotto, M; Gouveia, R; Adidin, F. Z; Figueiredo, F; Connon, C. J. Developing a Continuous Bioprocessing Approach to Stromal Cell Manufacture. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 29, p. 41131-41142, 2017.

Miramontes, E; Kempisty, B; Petite, J; Dasarathy, S; Kulus, M; Wieczorkiewicz, M; Mozdziak, P. Myogenic Response to Increasing Concentrations os Ammonia Differs between Mammalian, Avian, and Fish Species: Cell Differentiation and Genetic Study. **Genes**, v. 11, 2020.

Mohammadinejad, R; Shavandi, A; Raie, D. S; Sangeetha, J; Soleimani, M; Hajibehzad, S. S; Thangadurai, D; Hospet, R; Popoola, J. O; Arzani, A; Gómez-Lim, M. A; Iravani, S; Varma, R. S. Plant molecular farming: production of metallic nanoparticles and therapeutic proteins using green factories. **Green Chemistry**, v. 21, p. 1845-1865, 2019.

Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 773-785, 2014.

Nadernezhad, A; Caliskan, O. S; Topuz, F; Afghah, F; Erman, B; Koc, B. Nanocomposite Bioinks Based on Agarose and 2D Nanosilicates with Tunable Flow Properties and Bioactivity for 3D Bioprinting. **Applied Bio Materials**, v. 2, p. 786-806, 2019.

Narayanan, K; Zo, S; Han, S. Novel biomimetic chitin-glucan polysaccharide nano/microfibrous fungal-scaffolds for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 724-731, 2020.

Ng, S; Kurisawa, M. Integrating biomaterials and food biopolymers for cultured meat production. **Acta Biomaterialia**, v. 124, p. 108-129, 2021.

Nikolovski, J. & Mooney, D. J. Smooth muscle cell adhesion to tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 21. p. 2025-2032, 2000.

Nishimura, T. Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. **Meat Science**, v. 109, p.48-55, 2015.

Nseir, N; Regev, O; Kaully, T; Blumenthal, J; Levenberg, S; Zussman, E. Biodegradable scaffold fabricated of electrospun albumin fibers: mechanical and biological characterization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, p. 257-264, 2013.

Oliveira, S. M; Fasolin, L. H; Vicente, A. A; Fuciños, P; Pastrana, L. M. Printability, microstructure, and flow dynamics of phase-separated edible 3D inks. **Food Hydrocolloids**, v. 109, 2020.

O'Neil, E. N; Cosenza, Z. A; Baar, K; Block, D. E. Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, p. 686-709, 2021.

Orellana, N; Sánchez, E; Benavente, D; Prieto, P; Enrione, J; Acevedo, C. A New Edible Film to Produce In Vitro Meat. **Foods**, v. 9, 2020.

Ouyang, L; Highley, C. B; Rodell, C. B; Sun, W; Burdick, J. A. 3D Printing of Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels with Secondary Cross-Linking. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, p. 1743-1751, 2016.

Park, H; Kim, P. H; Hwang, T; Kwon, O. J; Park, T. J; Choi, S. W; Yun, C. O; Kim, J. H. Fabrication of cross-linked alginate beads using electrospraying for adenovirus delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 417-425, 2012.

Park, S. M; Kim, H. W; Park, H. J. Callus-based 3D printing for food exemplified with carrot tissues and its potential for innovative food production. **Journal of Food Engineering**, v. 271, 2020.

Park, Y; Chen, Y; Ordovas, L; Verfaillie, C. M. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers. **Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 39-48, 2014.

Paul, C; Leser, S; Oesser, S. Significant Amounts of Functional Collagen Peptides Can Be Incorporated in the Diet While Maintaining Indispensable Amino Acid Balance. **Nutrients**, v. 11, 2019.

Peng, Y. Y; Yoshizumi, A; Danon, S. J; Glattauer, V; Prokopenko, O; Mirochnitchenko, O; Yu, Z; Inouye, M; Werkmeister, J. A; Brodsky, B; Ramshaw, J. A. M. A Streptococcus pyogenes derived collagen-like protein as a non-cytotoxic and non-immunogenic cross-linkable biomaterial. **Biomaterials**, v. 31, p. 2755-2761, 2010.

Post, M. J. An alternative animal protein source: cultured beef. **Frontiers in Agricultural Sustainability: Studying the Protein Supply Chain to Improve Dietary Quality**, v. 1328, p. 29-33, 2014.

Post, M. J; Levenberg, S; Kaplan, D. L; Genovese, N; Fu, J; Bryant, C. J; Negowetti, N; Verzijden, K; Moutsatsou, P. Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. **Nature Food**, v. 1, p. 403-415, 2020.

Rad-Malekshahi, M; Flement, M; Hennink, W. E; Mastrobattista, E. Optimization of the recombinant production and purification of a self-assembling peptide in Escherichia coli. **Microbial Cell Factories**, v. 31, 2014.

Recouvreux, D. O. S; Rambo, C. R; Berti, F. V; Carminatti, C. A; Antônio, R. V; Porto, L. M. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 151-157, 2011.

Richardson, J. F. & Zaki, W. N. Sedimentation and fluidisation: Part 1. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 32, p. 35-53, 1954.

Rischer, H; Szilvay, G. R; Oksman-Caldentey, K. M. Cellular agriculture—Industrial biotechnology for food and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 128-134, 2020.

Rnjak-Kovacina, J; Wray, L; Burke, K; Torregrosa, T; Golinski, J; Huang, W; Kaplan, D. Lyophilized Silk Sponges: A Versatile Biomaterial Platform for Soft Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 1, p. 260-270, 2015.

Rnjak-Kovacina, J; Wray, L; Burke, K; Torregrosa, T; Golinski, J; Huang, W; Kaplan, D. Lyophilized Silk Sponges: A Versatile Biomaterial Platform for Soft Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 1, p. 260-270, 2015.

Rodrigues, A; Rodrigues, C; Gomes, A; Vieira, S; Badenes, S; Diogo, M; Cabral, J. Dissolvable Microcarriers Allow Scalable Expansion And Harvesting of Human Induced Pluripotent Stem Cells Under Xeno-Free Conditions. **Biotechnology Journal**, v. 14, 2019.

Röös, E; Bajžel, B; Smith, P; Patel, M; Little, D; Garnett, T. Greedy or needy? Land use and climate impacts of food in 2050 under different livestock futures. **Global Environmental Change**, v. 47, p. 1-12, 2017.

Sarker, B; Zehnder, T; Rath, S. N; Horch, R. E; Kneser, U; Detsch, R; Boccaccini, A. R. Oxidized Alginate-Gelatin Hydrogel: A Favorable Matrix for Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells in 3D. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, p. 1730-1737, 2017.

Schoen, B; Avrahami, R; Baruch, L; Efraim, Y; Goldfracht, I; Elul, O; Davidov, T; Gepstein, L; Zussman, E; Machluf, M. Electrospun Extracellular Matrix: Paving the Way to Tailor - Made Natural Scaffolds for Cardiac Tissue Regeneration. **Advanced Functional Materials**, v. 27, 2017.

Seibert, K. D. & Burns, M. A. Simulation of fluidized beds and other fluid-particle systems using statistical mechanics. **AIChE Journal**, v. 42, p. 660 - 670, 1996.

Seidel, J; Ahlfeld, T; Adolph, M; Kümmritz, S; Steingroewer, J; Krujatz, F; Bley, T; Gelinsky, M; Lode, A. Green bioprinting: extrusion-based fabrication of plant cell-laden biopolymer hydrogel scaffolds. **Biofabrication**, v. 9, 2017.

Shahin-Shamsabadi, A. & Selvaganapathy, P. R. Engineering Murine Adipocytes and Skeletal Muscle Cells in Meat-like Constructs Using Self-Assembled Layer-by-Layer Biofabrication: A Platform for Development of Cultivated Meat. **Cells Tissues Organs**, v. 211, p. 304-312, 2022.

Shahin-Shamsabadi, A. & Selvaganapathy, P. R.  $\pi$ -SACS: pH Induced Self-Assembled Cell Sheets Without the Need for Modified Surfaces. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, p. 5346-5356, 2020.

Shapira, A; Dvir, T. 3D Tissue and Organ Printing-Hope and Reality. **Advanced Science**, v. 8, 2011.

Shin, Y; Lee, J; Kim, M; Hong, S; Kim, B; Hyun, J; Choi, Y; Park, J; Han, D. Stimulating effect of graphene oxide on myogenesis of C2C12 myoblasts on RGD peptide-decorated PLGA nanofiber matrices. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, 2015.

Shit, S; Shah, P. Edible Polymers: Challenges and Opportunities. **Journal of Polymers**, v. 2014, 2014.

Simsa, R; Yuen, J; Stout, A; Rubio, N; Fogelstrand, P; Kaplan, D. Extracellular Heme Proteins Influence Bovine Myosatellite Cell Proliferation and the Color of Cell-Based Meat. **Foods**, v. 8, 2019.

Singh, S; Yap, W. S.; Ge, X. Y.; Min, V. L. X.; Choudhury, D. “Cultured meat production fuelled by fermentation”. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, p. 48-58, 2022.

Skylar-Scott, M. A; Uzel, S. G. M; Nam, L. L; Ahrens, J. H; Truby, R. L; Damaraju, S; Lewis, J. A. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. **Science Advances**, v. 5, 2019.

Sohn, S; Strey, H; Gido, S. Phase Behavior and Hydration of Silk Fibroin. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 751-757, 2004.

Stoll-Kleemann, S.; O’Riordan, T. “The sustainability challenges of our meat and dairy diets”. **Environment**, v. 57, p. 34-48, 2015.

Thyden, R; Perreault, L. R; Jones, J. D; Notman, H; Varieur, B. M; Patmanidis, A. A; Dominko, T; Gaudette, G. R. An Edible, Decellularized Plant Derived Cell Carrier for Lab Grown Meat. **Applied Sciences**, v. 12, 2022.

Tinafar, A; Jaenes, K; Pardee, K. Synthetic Biology Goes Cell-Free. **BMC Biology**, v. 64, 2019.

Tokudome, Y; Nakamura, K; Kage, M; Todo, H; Sugibayashi, K; Hashimoto, F. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 689-695, 2012.

Tonsor, G. T; Lusk, J. L; Schroeder, T. C. Assessing Beef Demand Determinants. **Cattlemen's Beef Board**, Denver, CO, 2018.

Turner, J. C; Collins, G; Blaber, E. A; Almeida, E. A. C; Arinzeh, T. L. Evaluating the cytocompatibility and differentiation of bone progenitors on electrospun zein scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 14, p. 173-185, 2020.

Turton, R. & Clark, N. N. An explicit relationship to predict spherical particle terminal velocity. **Powder Technology**, v. 53, p. 127-129, 1987.

Tzezana, R; Zussman, E; Levenberg, S. A layered ultra-porous scaffold for tissue engineering, created via a hydrospinning method. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 14, p. 281-288, 2008.

Uehara, T. M; Paino, I. M. M; Santos, F. A; Scagion, V. P; Correa, D. S; Zucolotto, V. Fabrication of random and aligned electrospun nanofibers containing graphene oxide for skeletal muscle cells scaffold. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, p. 1437-1443, 2020.

Van Wezel, A. Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. **Nature**, v. 216, p. 64-65, 1967.

Varley, J. & Birch, J. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 29, p. 177-205, 1999.

Veerasubramanian, P. K; Thangavel, P; Kannan, R; Chakraborty, S; Ramachandran, B; Suguna, L; Muthuvijayan, V. An investigation of konjac glucomannan-keratin hydrogel scaffold loaded with Avena sativa extracts for diabetic wound healing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 165, p. 92-102, 2018.

Wang, X; Ao, Q; Tian, X; Fan, J; Tong, H; Hou, W; Bai, S. Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. **Polymers**, v. 9, 2017.

Wang, X; Wang, Q; Xu, C. Nanocellulose-Based Inks for 3D Bioprinting: Key Aspects in Research Development and Challenging Perspectives in Applications - A Mini Review. **Bioengineering**, v. 7, 2020.

Xiang, N; Yuen Jr. J. S. K; Stout, A. J; Rubio, N. R; Chen, Y; Kaplan, D. L. 3D porous scaffolds from wheat glutenin for cultured meat applications. **Biomaterials**, v. 285, 2022.

Xu, L. H; Li, J. J; Zeng, H. B; Zhang, X. J; Cosnier, S; Marks, R. S; Shan, D. ATMP-induced three-dimensional conductive polymer hydrogel scaffold for a novel enhanced solid-state electrochemiluminescence biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 143, 2019.

Yao, D; Dong, S; Lu, Q; Hu, X; Kaplan, D; Zhang, B; Zhu, H. Salt-Leached Silk Scaffolds with Tunable Mechanical Properties. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 3723-3729, 2012.

Yeatts, A. B; Fisher, J. P. Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. **Bone**, v. 48, p. 171-181, 2011.

Yeo, M; Kim, G. H. Anisotropically Aligned Cell-Laden Nanofibrous Bundle Fabricated via Cell Electrospinning to Regenerate Skeletal Muscle Tissue. **Small**, v. 14, 2018.

Zadeh, A. H. A; Hosseini, S. F. Electrospun essential oil-doped chitosan/poly( $\epsilon$ -caprolactone) hybrid nano fibrous mats for antimicrobial food biopackaging exploits. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, 2019.

Zeltinger, J; Sherwood, J; Graham, D; Müller, R; Griffith, L. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. **Tissue Engineering**, v. 7, 2001.

Zessen, E. V; Tramper, J; Rinzema, A; Beeftink, H. H. Fluidized-bed and packed-bed characteristics of gel beads. **Chemical Engineering Journal**, v. 115, p. 103-111, 2005.

Zhu, T; Moussa, E; Witting, M; Zhou, D; Sinha, K; Hirth, M; Gastens, M; Shang, S; Nere, N; Somashekar, S; Alexeenko, A; Jameel, F. Predictive models of lyophilization process for development, scale-up/tech transfer and manufacturing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik**, v. 128, p. 363-378, 2018.

Zhu, W; Wu, Z; Wang, P; Liu, T; Guo, M; Ji, J; He, M; Wang, H; Zhang, P. Biodegradable GdPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O/PLGA microcarriers for stem cell delivery and non-invasive MRI translocation tracing. **Journal of Materials Science**, v. 57, 2022.