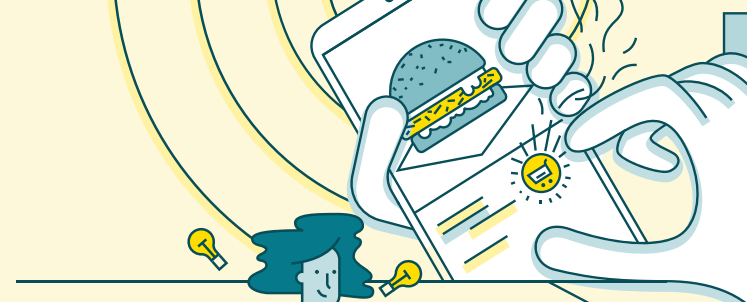


SÉRIE TECNOLÓGICA DAS
PROTEÍNAS ALTERNATIVAS

Carne Cultivada





Apresentação

O The Good Food Institute (GFI) é uma organização internacional sem fins lucrativos que trabalha para transformar o sistema de produção de alimentos. Nós atuamos no Brasil, Estados Unidos, Índia, Israel, em países da Europa e da região Ásia-Pacífico para construir um mundo onde proteínas alternativas não sejam mais alternativas. Somos financiados por filantropia, e todo nosso trabalho é prestado gratuitamente à sociedade. Nós existimos para tornar os sistemas alimentares melhores para o planeta, para as pessoas e para os animais. Para isso, identificamos as soluções mais efetivas, buscamos recursos e talentos e empoderamos parceiros em todo o sistema de alimentos, a fim de tornar as proteínas alternativas mais acessíveis.

Reimaginar a forma como obtemos proteína para consumo humano é urgente e fundamental. Produtos análogos aos de origem animal obtidos a partir de plantas são uma das alternativas concretas para ajudarmos o Brasil na sua transição para uma agricultura segura, justa e sustentável. Lado a lado com as proteínas sustentáveis de origem animal, podemos formar uma resposta consistente do nosso país e da nossa economia agrícola ao novo cenário,

no qual diferentes fontes de obtenção de proteína para consumo humano conviverão. Esse é um mercado “e” e não um mercado “ou”: há espaço e demanda para atuação de todos.

A importância de uma compilação robusta de dados sobre o estado-da-técnica no desenvolvimento desse segmento motivou o GFI Brasil, em parceria com o Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), a lançar este fascículo da Série Tecnológica em Proteínas Alternativas, abordando uma revisão bibliográfica abrangente sobre a tecnologia de cultura celular para obtenção de proteínas. Inicialmente, são apresentadas as principais características técnicas do processo de produção, que incluem linhagens celulares, meios de cultivos, estruturação para cultivo e equipamentos (biorreatores). Para tanto, o estudo consiste em uma revisão bibliográfica de artigos internacionais publicados em anos recentes com foco nas características dos processos. Esperamos que este fascículo da Série Tecnológica em Proteínas Alternativas seja uma fonte de conhecimento sobre a tecnologia de produção de alimentos feitos de plantas análogos aos produtos de origem animal, partindo do conjunto único de informações científicas aqui apresentado.

Ficha de Créditos

Autores

Fabiana Andrea Barrera Galland
Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Revisão

Katherine Helena Oliveira de Matos
Mariana Demarco
Amanda Leitolis
Cristiana Ambiel
Lorena Silva Pinho
Isabela de Oliveira Pereira

Projeto Gráfico

Fabio Cardoso

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP

G163

Galland, Fabiana Andrea Barrera: Pacheco, Maria Teresa Bertoldo
Carne cultivada / Fabiana Andrea Barrera Galland e Maria Teresa Bertoldo
Pacheco. – São Paulo: Tiki Books: The Good Food Institute Brasil, 2022. (Série
Tecnológica das Proteínas Alternativas)
E-Book: PDF, 30 p.; IL.

ISBN 978-65-87080-40-6

1. Alimentos. 2. Cadeia Produtiva Alimentar. 3. Tecnologia de Alimentos. 4.
Inovação. 5. Proteínas Alternativas. 6. Carne Cultivada. I. Título. II. Série. III.
Etapas do processo de produção de carne cultivada por meio de cultivo de
células. IV. Principais características do processo de produção de carne cultivada.
V. Galland, Fabiana Andrea Barrera. Vi. Pacheco, Maria Teresa Bertoldo. VII. Série
Tecnológica das Proteínas Alternativas. VIII. IFC/Brasil.

CDU 664

CDD 664

Catalogação elaborada por Regina Simão Paulino – CRB 6/1154

Índice

1. Introdução	5
2. Etapas do processo de produção de carne cultivada por meio de cultivo de células	8
3. Principais características do processo de produção de carne cultivada	10
3.1. Linhagens celulares	11
3.2. Meios de cultivo	15
3.3. Biorreatores	19
3.4. Estruturação	20
3.5 Produto final e seu processamento	22
Saiba mais	23
Referências	24

1. Introdução



Imagem ilustrativa de carne cultivada. Fonte: Adobe Stock.



Imagem ilustrativa de laboratório. Fonte: Shutterstock.

A pesquisa em relação acerca da produção de carne cultivada vem crescendo aceleradamente nos últimos seis anos. Diversos grupos ao redor do mundo vêm pesquisando condições de cultivo mais apropriadas e eficientes para produção em escala industrial, que permitam um processo seguro, menos custoso e mais rentável. Apesar da tecnologia estar mais desenvolvida para cultura de células animais, para produção de carne de bovino, suíno e frango, pescados e frutos do mar, processos similares têm sido desenvolvidos para produção de leite, colágeno e ovos.

Carne cultivada é a genuína carne animal ou de frutos do mar. Ela é composta pelos mesmos tipos de células dispostas na estrutura tridimensional do tecido muscular animal e, por isso, ela é capaz de replicar o perfil sensorial e nutricional da carne convencional.

Uma cadeia produtiva inteira está se formando ao redor do tema, desde fornecedores de linhagens celulares, meios de cultura e *design* de bioprocessos até a fabricação de biorreatores, otimização de processos biotecnológicos, biomateriais para suportes (*scaffolds*) e tecnologias para *downstreaming* do processo de produção de

carne cultivada. O interesse é crescente, e tem se dedicado muita pesquisa e investimento ao desenvolvimento dessa tecnologia. Paralelamente, órgãos reguladores e o setor produtivo já buscam estruturar o marco regulatório para garantir a segurança do produto e viabilizar sua comercialização.

Estudos anteriores demonstram que o setor da agropecuária representa 30% da ocupação da superfície terrestre e 70% das terras agrícolas (Bhat, Morton, Mason, Bekhit, & Bhat, 2019). Ainda assim, a demanda de consumo de carne tende a dobrar até 2050, fazendo com que a produção da carne na forma tradicional não seja sustentável (Henchion, Hayes, Mullen, Fenelon, & Tiwari, 2017). Em relação às questões de sustentabilidade durante a produção de carne, é preciso considerar não só a emissão de CO² pela fermentação entérica durante a criação dos animais, mas também as atividades relacionadas à produção de ração, como o uso de fertilizantes e pesticidas, uso de terra e consumo de água pela agricultura, além dos produtos veterinários para tratamento dos animais.

A produção de carne utilizando animais é considerada ineficiente, uma vez que esses seres consomem grande quantidade de alimentos, sendo a maior parte da energia gasta com o seu próprio metabolismo e na produção de tecidos não comestíveis (como ossos, tendões e couro). Em contrapartida, a estrutura da carne cultivada não contém miudezas ou componentes não comestíveis, o que não apenas reduz o tempo de produção, mas também diminui a quantidade de nutrientes necessária por quilograma de carne.

Em termos de consumo de água e emissão de gases de efeito estufa, o cultivo de carne tem potencial para ser mais eficiente que a carne convencional (Bhat et al., 2019). Ainda, acredita-se que o uso de células cultivadas permitiria o controle no uso de antibióticos na produção, reduzindo seu consumo, bem como os problemas relacionados à resistência antimicrobiana pelo seu uso na agropecuária.

A produção de carne cultivada também está embasada em aspectos éticos em relação ao uso de animais para a alimentação humana. Considera-se que a indústria da carne em geral (gado, aves ou suínos) apresenta condições críticas de criação, como superconfinamento e maus tratos. Ainda, inevitavelmente, exige o abate animal para obtenção do produto final.

O risco de disseminação de doenças infecciosas por microrganismos, como os do gênero *Salmonella* e *Listeria*, também é minimizado na produção de carne cultivada, uma vez que permite maior controle das condições assépticas da produção. A carne produzida pode passar por um rigoroso controle de qualidade, possibilitando que se tenha um produto final livre de infecções, doenças, parasitas ou mesmo contaminantes químicos. Além disso, com maior controle sobre os ingredientes adicionados, tipo de células e sua diferenciação sob esse sistema, a composição do produto desenvolvido poderá vir a ser adaptada de acordo com as demandas dos consumidores.



Fazenda de animais. Crédito: Jo Anne McArthur.

2. Etapas do processo de produção de carne cultivada por meio de cultivo de células



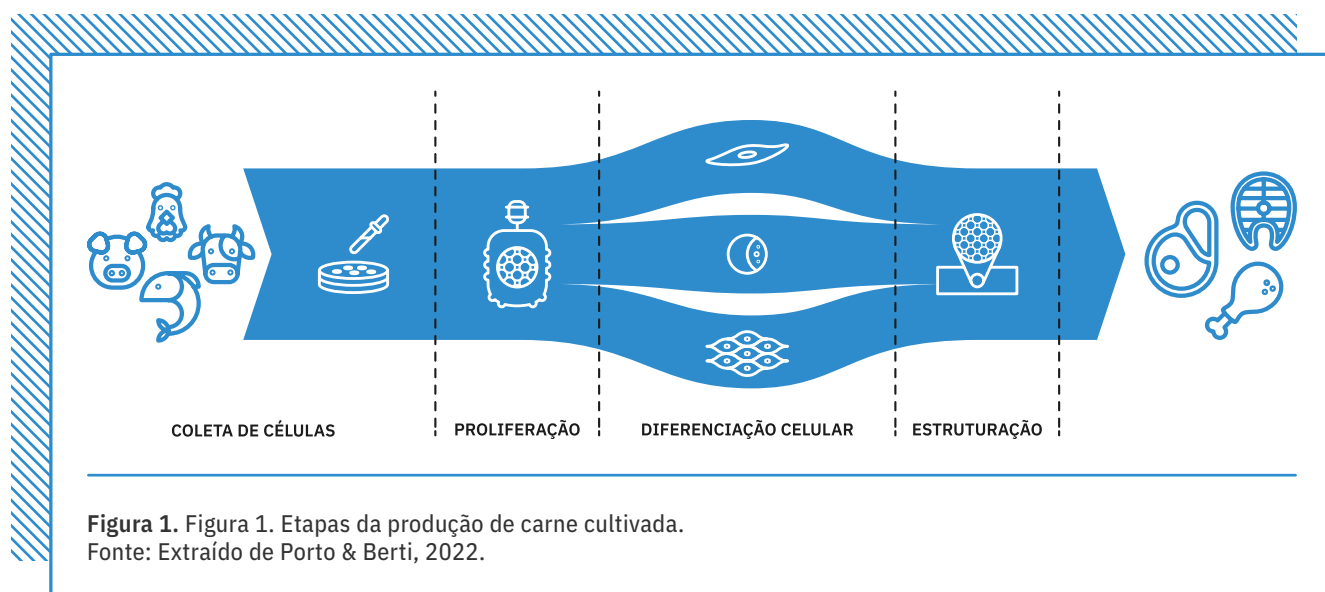
Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Adobe Stock.

O processo de produção de carne cultivada depende da aplicação de conhecimentos multidisciplinares como, por exemplo, os das áreas de engenharia de alimentos, de tecidos e de bioprocessos, bem como biologia celular, bioquímica e genética. A Figura 1 descreve a produção de carne cultivada de forma resumida, podendo ser dividida em quatro etapas principais: (1) coleta de células; (2) proliferação em biorreatores; (3) diferenciação celular em miofibras, adipócitos ou outros tipos celulares; e (4) estruturação em suportes (*scaffolds*). Ao final ocorre a coleta da carne cultivada e seu processamento em produto cárneo. A composição do meio de cultivo é determinante para garantir a eficiência do processo, principalmente no que diz respeito à proliferação e diferenciação



Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Adobe Stock.

celular. O produto de carne cultivada pode ser apresentado ao consumidor em forma de hambúrguer, *nuggets*, almôndegas ou mesmo em cortes inteiros, como bifes ou pedaços de frango. Ainda, dependendo do produto desejado, pode ser considerada a adição de outras substâncias como aromatizantes, aglutinantes, aditivos produzidos por fermentação ou compostos à base de plantas.



3. Principais características do processo de produção de carne cultivada



Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Adobe Stock.



A seguir são apresentadas as principais características do processo de produção de carne cultivada. Esta seção está dividida em cinco pontos principais: as linhagens celulares; os meios de cultivo; os biorreatores; a estruturação; e processamento do produto final.

3.1. Linhagens celulares

O processo de produção de carne cultivada envolve o isolamento de células (em geral células-tronco) a partir da coleta de tecidos de animais para, em seguida, permitir que elas se proliferem em quantidade adequada em um sistema *in vitro* e se diferenciem em células maduras que constituem a carne, como miócitos e adipócitos. De modo geral, dois tipos principais de células podem ser usados: (1) células primárias, cujo cultivo é estabelecido diretamente dos tecidos animais; e (2) linhagens celulares, adaptadas para serem mantidas por longos períodos em cultura e, portanto, podem ser subcultivadas diversas vezes (Coecke et al., 2005). Entre as células-tronco obtidas do tecido primário podem ser citadas as células-tronco embrionárias – as quais são pluripotentes, ou seja, capazes de gerar qualquer tipo

Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Shutterstock.

celular – e as células-tronco adultas, obtidas de tecido adulto e distribuídas pelo corpo em diferentes tecidos, as quais apresentam um potencial de diferenciação mais limitado (multipotentes), uma vez que criam células da mesma camada germinativa ou do mesmo tipo de órgão.

As células embrionárias, por sua vez, são obtidas do blastocisto, estrutura formada alguns dias após a fertilização no corpo do animal ou por fertilização *in vitro*. O uso desse tipo celular para produção de carne cultivada é mais desafiador, porque a obtenção das células e as condições de cultivo geralmente requerem fatores de crescimento e inibidores de diferenciação espontânea específicos para cada espécie (Wu & Izpisua Belmonte, 2015).

Outras células com característica pluripotente são as chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, derivado do inglês *induced pluripotent stem cells*). Nesse caso, células somáticas de adulto, como fibroblastos da pele ou leucócitos do sangue, são submetidas a um processo de reprogramação para voltarem a um estado indiferenciado, que pode envolver a utilização de fatores de transcrição específicos (Oct4, Klf4, c-Myc e Sox2). Em seguida, as iPSCs podem ser diferenciadas para células de tecidos específicos, como células musculares ou adipócitos (Takahashi & Yamanaka, 2006). Esse processo apresenta alguns desafios tecnológicos e é obtido por diferentes metodologias de engenharia genética. Atualmente, a maior parte dos estudos sobre o tema utiliza células de animais de laboratório, como rato ou camundongo, enquanto um número menor de trabalhos propõe a geração de iPSCs de bovinos e de outros animais da cadeia de carnes convencional (Bogliotti et al., 2018).

As células-tronco adultas têm sido as mais empregadas para produção de carne cultivada. Elas apresentam capacidade de diferenciação mais limitada e permanecem em estado quiescente nos tecidos adultos, com um papel fisiológico importante na regeneração do tecido para reposição de células mortas ou danificadas. As células-tronco adultas podem ser obtidas de diversos órgãos ou tecido por meio de coletas semelhantes a biópsias de medula, tecido adiposo ou músculo. Atualmente, três tipos principais de células-tronco adultas

são utilizadas para a produção de carne cultivada: células-satélite musculares, células-tronco mesenquimais e progenitores fibro/adipogênicos (FAPs).

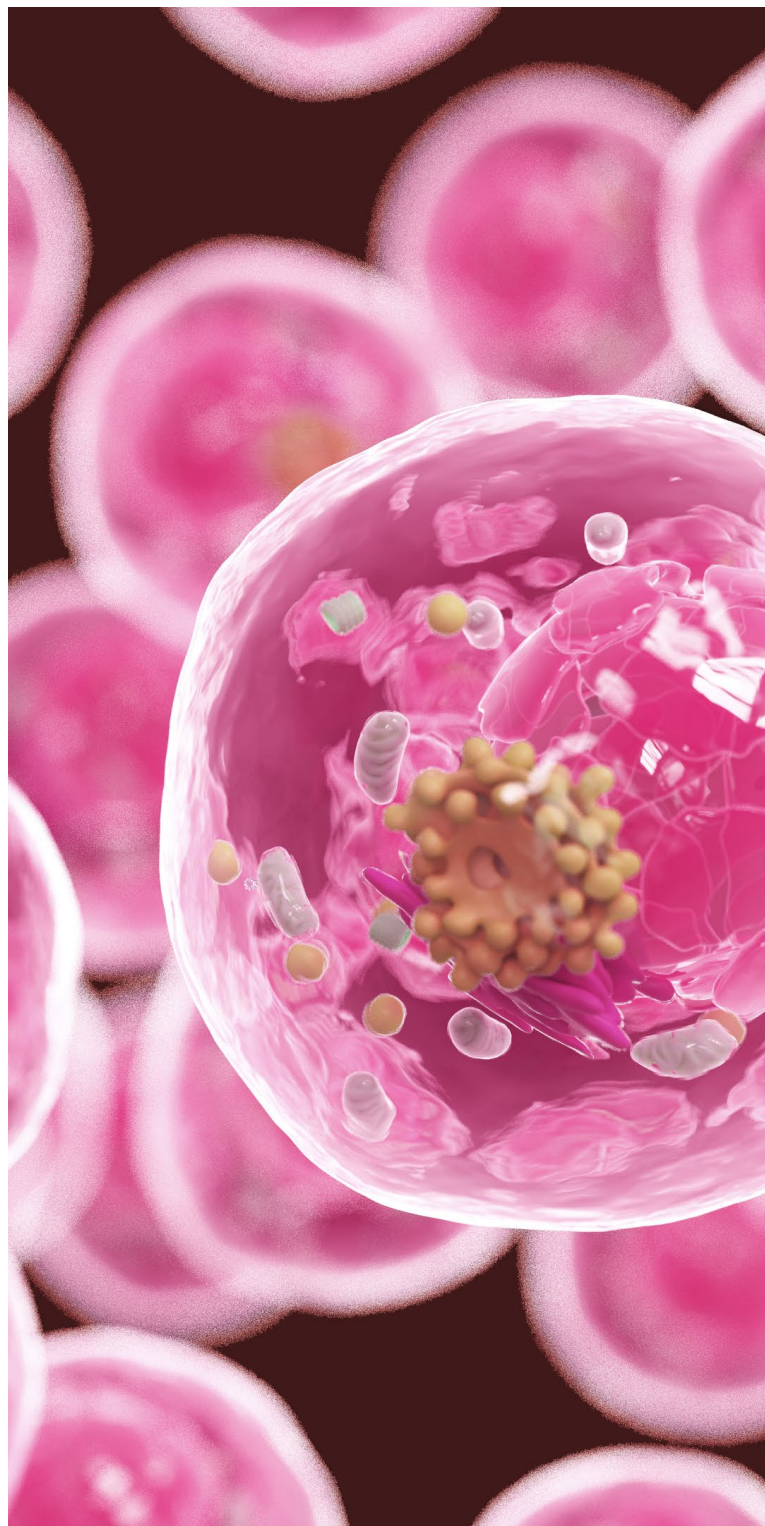
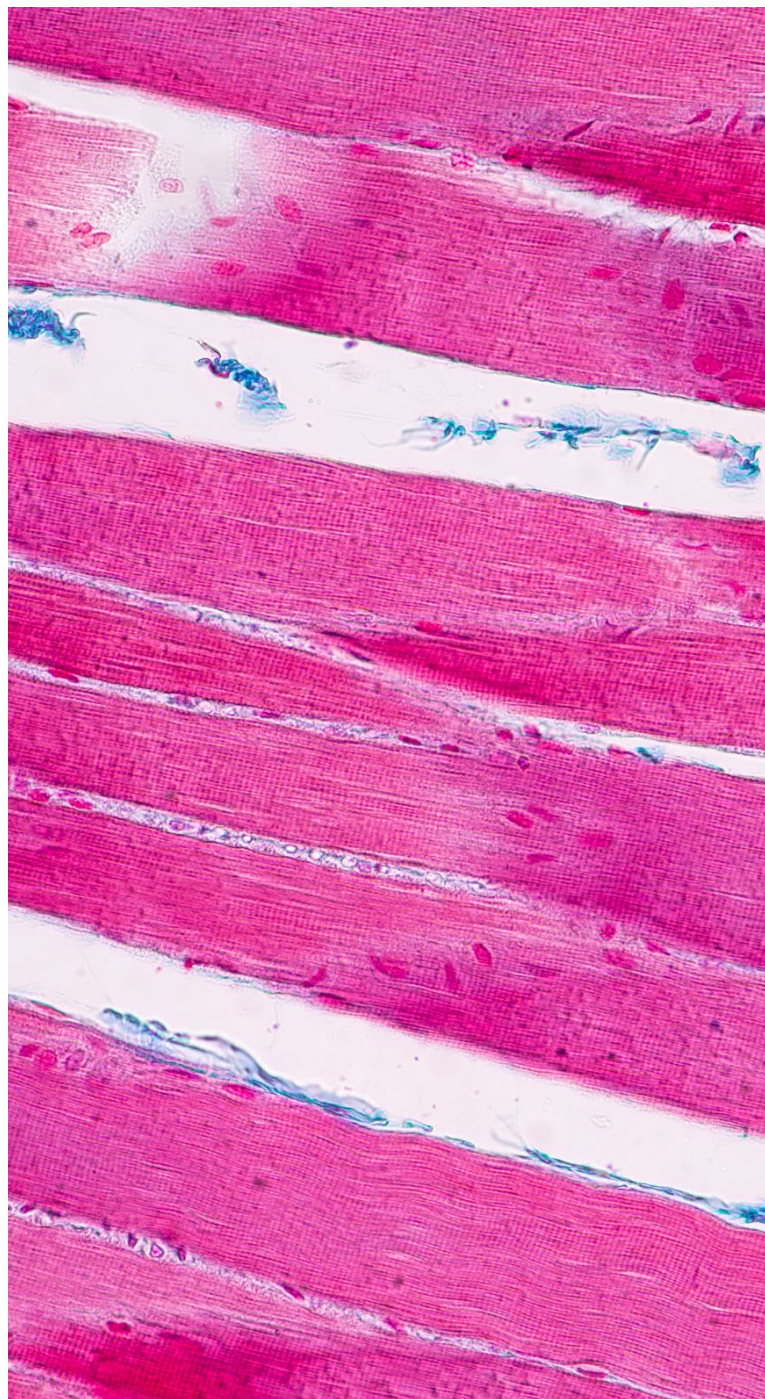


Ilustração 3D de célula animal. Fonte: Adobe Stock.

As células satélites são encontradas na membrana basal da fibra muscular e são capazes de se diferenciar em miócitos. Elas são comumente utilizadas para iniciar o processo de produção de carne cultivada, uma vez que são abundantes e requerem menor esforço para diferenciação (Wosczyzna & Rando, 2018). Em condições de cultivo, as células mesenquimais são capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e fibroblastos, enquanto as células fibro/adipogênicas podem se diferenciar em fibroblastos e adipócitos. Juntas, elas são capazes de compor todos os principais tipos celulares que formam a carne convencional. A diferenciação em tecido específico é induzida por fatores bioquímicos com o objetivo de induzir a expressão de genes de diferenciação. Diversos estudos estão sendo realizados com essas células para produção de carne em escala industrial, o que requer otimização para aumentar a capacidade de diferenciação e proliferação e reduzir a dependência de biópsia recorrente para obtenção das células iniciais (Reiss, Robertson, & Suzuki, 2021).

Para o cultivo de carne em escala industrial torna-se necessário aumentar a capacidade de divisões celulares, a qual é limitada em condições naturais, após a célula entrar em estágio de senescência. Portanto, a imortalização dessas células é uma das alternativas para prosseguir a proliferação e rendimento em escala. A imortalização pode ser obtida por modificações epigenéticas e super expressão das enzimas telomerasas (Ramboer et al., 2014; Huang, Liang, Liu,

Huang, & Songyang, 2014; Hochedlinger & Jaenisch, 2015). A tecnologia para esse processo está em crescente aprimoramento, e diversos estudos estão sendo realizados para adaptação de tal tecnologia com células de animais de criação.



Músculo esquelético de tecido mamífero sob o microscópio. Fonte: Adobe Stock.



Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Shutterstock.

Os protótipos atuais de carne cultivada são baseados principalmente em células musculares. Contudo, cabe ressaltar que um pedaço de carne convencional contém diferentes proporções de outros elementos, como sangue, nervos e tecido adiposo, que devem ser considerados para aprimorar o sabor e textura. Algumas combinações estão sendo testadas, como o acréscimo de células de gordura ao tecido muscular, cultivadas separadamente, obtendo-se um produto final de carne cultivada em forma de guisado. Além disso, pesquisadores estão trabalhando no desenvolvimento de técnicas de cocultura de células (mais de um tipo celular), como o cultivo de miócitos e adipócitos conjuntamente. Cabe ressaltar que essa tecnologia precisa ser aprimorada, uma vez que diferentes células apresentam especificidades nutricionais diversas, bem como tempo de maturação.

A produção de carne cultivada deve levar em conta também as características de cor, sabor, textura e propriedades nutricionais do alimento. Várias mudanças bioquímicas podem interferir nas características sensoriais, como processos durante o período inicial pós-morte, glicólise *post mortem*, *rigor mortis*, declínio de pH, ativação calpaína, entre outros (Bhat et al., 2019). A ausência dessas etapas pode afetar a qualidade geral da carne produzida. A exemplo disso, o aspecto da carne bovina cultivada tende a ser mais amarelado do que avermelhado em comparação à carne natural, devido à redução da expressão de mioglobina. No entanto, condições de cultivo variadas como baixa disponibilidade de oxigênio podem aumentar a expressão de mioglobina, recuperando a coloração vermelha (Kanatous & Mammen, 2010).

O processo de cultivo projeta a formação de bancos de células que irão permitir a independência do uso de animais no processo de obtenção das células, bem como irão garantir a estabilidade da linhagem celular e a consistência do tipo celular cultivado. A ideia é que as células sejam selecionadas, validadas e congeladas em pequenos lotes, permitindo o uso gradual ao longo do tempo. Essas poderão ser descongeladas, validadas novamente e replicadas, mantendo a expansão contínua. O procedimento de congelamento deve ser padronizado no que diz respeito ao meio e à técnica utilizados. Normalmente o congelamento rápido reduz o risco de cristalização intracelular comum ao processo usual de solidificação. O meio de congelamento e as substâncias crioprotetoras adicionadas devem ser testados quanto à toxicidade e à segurança no processo de cultivo posterior (Elliott, Wang, & Fuller 2017).

Em resumo, ainda existem muitos tópicos a serem explorados em função da variabilidade de obtenção dos tipos celulares. A origem do animal pode exigir otimizações variadas. Ainda, a raça, a idade, o sexo, as particularidades genéticas de cada indivíduo, a metodologia usada para coleta de células do animal e o tipo de tecido de onde será retirada a população celular inicial são todos fatores que podem influenciar no resultado final (Kytälä et al., 2016). Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar a potencialidade de cada tipo celular, a acessibilidade das culturas celulares e como as propriedades de cada célula podem influenciar as próximas etapas de cultivo.

3.2. Meios de cultivo

Após o procedimento de coleta das células, essas são isoladas e cultivadas em meio de cultura apropriado. A composição do meio é extremamente importante, pois pode influenciar a eficiência do crescimento e as características finais do produto. Historicamente, as formulações de meio de cultivo foram desenvolvidas objetivando uma aplicação na indústria farmacêutica, tornando os atuais custos de produção de meios de cultivo celular muito elevados e incompatíveis com o esperado para a indústria de alimentos. Por isso, os meios de cultivo são considerados elementos críticos para a produção industrial de carne cultivada.



Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Adobe Stock.

Um meio de cultivo consiste em uma formulação padrão contendo glicose, sais inorgânicos, vitaminas solúveis, aminoácidos e tampões que otimizam o processo de crescimento celular (van der Valk et al., 2010). Contudo, a demanda celular de nutrientes pode variar em diferentes fases do crescimento celular, tal como a etapa de diferenciação, proliferação e síntese proteica, bem como em relação à espécie e tipo celular cultivado (Burton, Vierck, Krabbenhoft, Byrne, & Dodson, 2000; Yao & Asayama, 2017).

Meios de cultivo com composição definida já são comercializados, com variações nos níveis de glicose, piruvato e outros componentes que melhor se adequam ao tipo celular em cultivo. No entanto, as informações sobre sua formulação muitas vezes são limitadas, uma vez que é um parâmetro de diferenciação competitiva. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas para otimizar os meios de cultura com novas tecnologias para isolamento dos compostos. Por exemplo, a obtenção dos compostos normalmente ocorre pela alta purificação de aminoácidos e açúcares. Contudo, o uso de hidrolisados ou polissacarídeos de processamento agrícola em grande escala podem vir a servir como insumos para os meios de cultura da carne cultivada (Girón-Calle et al., 2008; Babcock, Smith, Huntinga, & Merrill, 2012). Ainda, análises estatísticas e de bioinformática podem ajudar a equilibrar os tipos de componentes e seus níveis mais aceitos para aplicação como meio de cultura de uma célula em específico, após

validação em culturas em grande escala. Essa abordagem reduziria significativamente o tempo e os recursos necessários para otimizar os meios de cultivo personalizados para cada célula (Jamal, Alam, & Salleh, 2008).

A formulação de um meio de cultivo basal é muitas vezes suficiente para manter as células vivas por curtos intervalos de tempo, mas para que elas proliferem de forma eficiente por longos períodos é necessário oferecer suplementação. Nesse sentido, o soro fetal bovino (SFB) tem sido usado como suplementação do meio basal em ensaios laboratoriais. O soro bovino é o mais comum, mas utilizam-se também de outras origens, como de cavalo ou extratos de embrião de galinha (Burattini et al., 2004; Chiron et al., 2012). A composição do soro é extremamente complexa, sendo uma mistura rica em proteínas e aminoácidos, ácidos graxos, hormônios e fatores de crescimento. Contudo, o SFB contém centenas ou mesmo milhares de componentes diferentes, e a verdadeira composição e quantidades desses componentes são desconhecidas, tornando-o um produto quimicamente indefinido. A composição varia de acordo com a região geográfica (onde a dieta de um animal pode variar), por lote dentro da mesma região geográfica, pela sazonalidade da coleta, pela quantidade e identidade dos antibióticos ou hormônios recebidos pela mãe e pela idade gestacional do feto. Ainda não se sabe muito bem quais são os componentes especificamente responsáveis por promover o crescimento celular *in vitro*

(van der Valk et al., 2010), mas a seleção específica deles poderá acelerar o processo de crescimento celular e aprimorar o processo de cultivo.

Apesar de seus benefícios, a utilização de SFB não é esperada para a produção em larga escala de carne cultivada, e o desenvolvimento de substitutos de SFB é prioridade na maior parte das empresas de cultivo de carne. Além da composição química indefinida, que pode acarretar diferenças de eficiência entre lotes de produção, os soros animais são potenciais fontes de contaminação de diferentes microrganismos. Além disso, por questões éticas, o uso do SFB está desalinhado com um dos benefícios fundamentais da carne cultivada, que é a produção do alimento por meio de um processo produtivo que respeite os animais.

Visando reduzir a heterogeneidade dos meios de cultivo convencionais à base de suplementação com SFB, diversos estudos visam à produção de meios de cultivo sintéticos, em que se teria a definição dos componentes e suas respectivas concentrações (O'Neill, Cosenza, Baar, & Block, 2021). Nesse sentido, técnicas inovadoras estão sendo estudadas, por exemplo a utilização de subprodutos da agroindústria e fermentação como fonte química de produtos presentes no meio de cultivo. Essa tecnologia pode reduzir os custos na produção de meio de cultivo, um fator fortemente limitante da produção em escala industrial. Outros métodos de

economia podem ser aplicados, como a reciclagem de meios de cultivo, os quais podem ser reutilizados em um novo processo de produção.

Além disso, a utilização de meios de cultivo sintéticos, com compostos definidos, pode reduzir a variabilidade entre lotes de soro e permitir a produção de meios de cultivo padronizados e em escala comercial. A fabricação de fatores de crescimento com origem diferente da animal vem sendo estudada por diferentes técnicas, tais como fermentação bacteriana ou por extratos de planta, ou, ainda, produção de proteínas recombinantes produzidas por fermentação (Jochems, van der Valk, Stafleu, & Baumans, 2002; van der Valk et al., 2010), inovações que prometem evoluir significativamente nos próximos anos. Da mesma maneira, a otimização das formulações poderá aumentar a eficiência de consumo e metabolismo celular (Shiozuka & Kimura, 2000).

Células com alta capacidade proliferativa exigem altas doses de nutrientes, tais como glicose e aminoácidos. Os aminoácidos podem ser obtidos por fermentação com consumo de glicose, mas fontes alternativas, como biomassa de algas e certas culturas bacterianas, podem representar boas estratégias para diminuir os custos de produção e ao mesmo tempo fomentar outros processos sustentáveis, como tratamento de resíduos e captura de CO² (Kim 2013; Matassa, Verstraete, Pikaar, & Boon, 2016). Estudos de engenharia metabólica computacional estão sendo realizados e

serão de grande importância para prever não apenas o estado funcional das células, mas também avaliar formulações de nutrientes ideais para o crescimento celular *in vitro* (Feist & Palsson, 2016).

Outros componentes comuns no meio de cultura são os antibióticos e antifúngicos, que reduzem a possibilidade de contaminação no processo de cultivo. Espera-se o uso desses compostos em concentrações reduzidas e/ou apenas em estágios iniciais no processo de cultivo, que apresenta uma maior probabilidade de contaminação, por isso é pouco provável que resíduos de antibióticos e antifúngicos permaneçam no produto final. Apesar disso, é recomendado que a utilização desses compostos seja regulamentada,

assim como ocorre na produção de carne convencional na agropecuária (Brasil, 2009). Isso é especialmente importante para culturas de tempo de cultivo prolongado, as quais são mais expostas à contaminação.

A composição dos meios de cultivo pode definir as características da carne. A deficiência de vitaminas, por exemplo, pode causar degeneração em células musculares (Braga, Simmons, Norris, Ferrini, & Artaza, 2017). As altas taxas de glicólise em células de cultivo podem causar acidose e deixar a carne mais opaca, assim como ocorre no músculo bovino quando altas taxas de glicólise são induzidas – nesse caso por diferenças climáticas, nutricionais e de estresse (Post et al., 2020). Portanto, são fundamentais os estudos para produção de meio de cultura altamente especializado para a demanda celular.

Além disso, a cultura de células mistas, com diferentes tipos de células, exigirá composições de meio variadas, uma vez que as demandas são diferentes para cada tipo celular. Ainda, nesse tipo de cultura pode ser que uma célula gere produtos intermediários que alterem o crescimento do outro tipo celular, comprometendo a eficiência de produção. Nesse contexto, a adoção de modificação genética poderia otimizar a eficiência de uso dos nutrientes pelas células, assim como o crescimento e adaptação a meios sintéticos ou melhorar características do produto final, como nutrição, sabor e textura (Lee et al., 2016).



Carne cultivada. Crédito: Aleph Farms



3.3. Biorreatores

Um dos grandes desafios no sistema de cultura de células é a produção em escala industrial. É necessário que todo o processo seja controlado, com alta replicação e que a densidade celular seja maior do que um sistema bidimensional, como normalmente é feito o cultivo celular em escala de bancada. Ao contrário de métodos manuais, os quais são caros, trabalhosos e possuem alto risco de contaminação, o processo de cultivo em escala industrial deve ocorrer em biorreatores. Com biorreatores, o processo pode ser automatizado, planejado e adequado para cada tipo celular, reduzindo a manipulação humana e os riscos de contaminação. Essas ferramentas permitem manter um ambiente controlado, com balanço de energia e retirada de calor do sistema, se necessário, de forma a preservar os padrões energéticos do sistema. Parâmetros tais como tipo de meio de cultura, temperatura, oxigênio e densidade celular devem permanecer estáveis ou variar de acordo com a demanda, de forma a padronizar o processo industrial. Os biorreatores são essenciais para a proliferação das células. Para isso,



Imagem ilustrativa de um biorreator. Fonte: Shutterstock.

os meios de cultura e a adição de fatores de crescimento podem ser alterados ao longo do processo para estimular a diferenciação celular ou aprimorar o crescimento e densidade celular (Braga et al., 2017; Allan, De Bank, & Ellis, 2019).

O design de um biorreator dependerá da forma do produto final, por exemplo, carne moída ou em formato de bife. Nem todos os biorreatores serão desenhados para abrigar suportes (*scaffolds*) no seu interior. Contudo, o seu tamanho poderá variar em função do modelo do suporte inserido – uma vez que depende do volume e da superfície –, bem como com a eficiência de semeadura do biorreator, a dinâmica de circulação do meio de cultivo pelo sistema, transferência de massa, custo etc. (Allan et al., 2019).

Existem diversas configurações de biorreatores. Um biorreator deve ser capaz de simular um sistema natural, em que as células são irrigadas por vasos sanguíneos que permitem a chegada de nutrientes para a manutenção da viabilidade celular. Existem biorreatores nos quais a célula cresce em suspensão, em microesferas, por exemplo, ou aderida a sistemas planares (Post et al., 2020). O cultivo em suspensão é preferido, já que permite maior agitação e aumenta a superfície de contato com o meio de cultivo, reduzindo a limitação de difusão de nutrientes (Hu, 2020). Sistemas de esferas suspensas em solução com agitação constante permitem um maior contato das células com o meio, sendo estruturas potencialmente candidatas para crescimento em larga escala (Bhat et al., 2019). Sistemas com alimentação contínua do meio de cultivo e agitação constante são interessantes por manterem um ambiente homogêneo. A mistura pode se dar por agitação mecânica, pneumática ou hidráulica, como biorreatores de tanque agitados por impulsor (STRs), biorreatores de parede giratória (RWBs) e biorreatores em ondas (Allan et al., 2019).

3.4. Estruturação

Uma outra questão desafiadora no processo de cultura de células é manter a disposição dessas unidades em crescimento alinhadas em forma de fibras, como ocorre naturalmente na carne convencional e na formação do tecido estruturado. As células de mamíferos normalmente requerem fixação em alguma superfície para



Biorreator *Airlift*. Crédito: BioReactor Sciences.

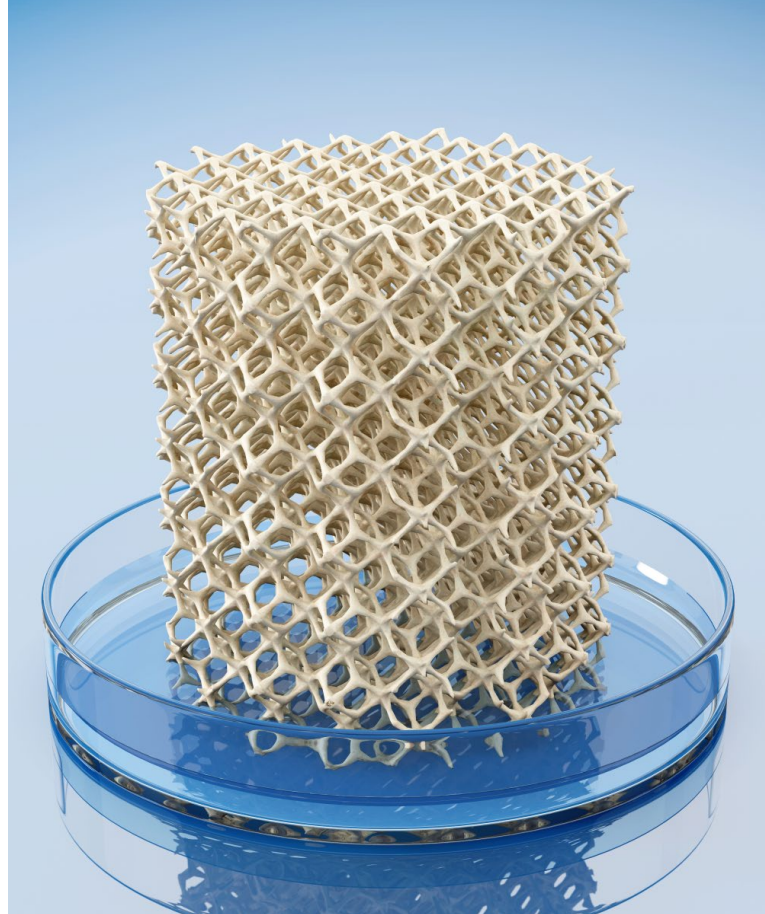


Biorreator de Perfusão. Crédito: Sartorius.

crescimento, por isso, diversos sistemas de ancoragem vêm sendo estudados para o cultivo de células em biorreatores, como os suportes para estruturação (*scaffolds*) e os microcarreadores. De forma geral, a proliferação dessas células começa em um pequeno sistema de cultura planar, seguida por expansão volumétrica em sequência e, finalmente, a maturação do produto em grandes biorreatores. Esses sistemas fornecem o suporte mecânico e a porosidade para troca de nutrientes, bem como conferem estrutura e textura mais similares à carne convencional.

Os microcarreadores são muito utilizados como matriz de ancoragem. Caracterizam-se por terem formato de microesferas, o que possibilita uma ampla área de ancoragem para as células em crescimento nos biorreatores, uma vez que as esferas ficam em suspensão na cultura. Eles podem ser compostos de diferentes materiais (sintéticos ou naturais), e idealmente aqueles usados para a produção de carne cultivada devem ser comestíveis. Caso o material não seja comestível, ele deve ser separado das células e removido do produto antes do processamento final, o que pode fazer com que muitas células sejam perdidas, comprometendo o rendimento do processo (Reiss et al., 2021).

Vários biomateriais sintéticos ou naturais, de origem animal e vegetal, têm sido usados na bioengenharia de tecidos como suporte para estruturação. O colágeno, por exemplo, tem obtido bastante sucesso para o cultivo, mas, como é de origem animal, representa



Estrutura de suporte utilizada para produzir cultivo celular (*scaffold*). Fonte: Shutterstock

uma fonte esgotável e não sustentável para a produção de carne (Dong & Lv, 2016). Compostos naturais provenientes da agricultura, formados por celulose, como a folha de espinafre descelularizada, foram testados como matrizes de apoio para miócitos, apresentando resultados promissores (Jones, Rebello, & Gaudette, 2021). Além disso, a soja texturizada pode representar uma alternativa viável como sistema de ancoragem, considerando que é um biomaterial proteico e poroso, além de comestível (Ben-Arye et al., 2020). Alguns outros compostos são sugeridos, como amilopectina, quitosana, dextrana etc., porém a aplicação para seu uso em alimentos precisa ser melhor estudada (Ben-Arye et al., 2020; Bodiou, Moutsatsou, & Post, 2020; Ong et al., 2021).

Outra tecnologia que vem sendo adaptada para estruturar a carne cultivada é a de bioimpressão 3D, combinada com princípios de engenharia para produção de tecidos ou órgãos (Gillispie et al., 2019). Essa tecnologia é aplicada na área clínica para geração de tecidos e desenvolvimento de órgãos anatômica e funcionalmente semelhantes aos humanos. No contexto da carne cultivada, essa técnica consiste em depositar biotintas contendo células e outros elementos a fim de obter um produto final com espessura, textura e características sensoriais dos cortes de carne tradicionais. Alguns desafios classicamente associados à engenharia de tecidos com foco em aplicações clínicas são dificuldade de vascularização, baixa resistência mecânica e limitações no aporte nutricional das células. (Mandrycky, Wang, Kim, & Kim, 2016).

3.5 Produto final e seu processamento

Uma vez finalizado o processo de cultivo celular, a carne cultivada é coletada para futura aplicação como carne fresca (carne, moída, bifes, pedaços de frango etc.) ou pode ser utilizada como matéria-prima na produção de inúmeros produtos cárneos (hambúrguer, nuggets, almôndegas, linguiças etc). Ainda, dependendo do produto desejado, podem ser adicionadas outras substâncias, como aromatizantes, aglutinantes e aditivos produzidos por fermentação, compostos à base de plantas (Onget al., 2021). Como a carne convencional, o produto cultivado também pode ser

submetido a processamentos subsequentes, como esterilização, tratamento por calor ou radiação, fermentação, tratamento enzimático, defumação, secagem, cura, pasteurização e outros (Post et al., 2020). O controle de qualidade e fiscalização dos produtos cárneos derivados da carne cultivada seguem os mesmos requisitos estabelecidos para os produtos convencionais. Ainda, o produto final poderá ser oferecido ao consumidor como uma mistura de carne cultivada e ingredientes *plant-based*. Por fim, da mesma forma que ocorre para os alimentos cárneos produzidos com carne convencional, a composição nutricional do produto final deverá ser determinada e informada no seu rótulo.



Carne cultivada produzida com tecnologia de impressão 3D. Crédito: Aleph Farms

Saiba mais

Para saber mais sobre carne cultivada, acesse:

[The science of cultivated meat](#)

[State of the industry report: cultivated meat and seafood](#)

[Carne Cultivada: perspectivas e oportunidades para o Brasil](#)

[Glossário: carne cultivada](#)



Sala de cultivo. Fonte: Upside Foods.

Referências

Allan, S. J., De Bank, P. A., & Ellis M. J. (2019). Bioprocess design considerations for cultured meat production with a focus on the expansion bioreactor. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00044>

Babcock, J. F., Smith S., Huntinga H., & Merrill, D. (2012). Enhancing performance in cell culture: Hydrolysates from plants for media supplementation. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 27(20).

Ben-Arye, T, Shandalov, Y., Ben-Shaul, S., Landau, S., Zagury, Y., Ianovici, I., Lavon, N., & Levenberg, S. (2020). Textured Soy Protein Scaffolds Enable the Generation of Three-Dimensional Bovine Skeletal Muscle Tissue for Cell-Based Meat. *Nature Food*, 1, 210-220. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0046-5>

Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., Bekhit, A. E. D. A., & Bhat, H. F. (2019). Technological, regulatory, and ethical aspects of in vitro meat: A future slaughter-free harvest. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 1192-1208. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12473>

Bodiou, V., Moutsatsou, P., & Post, M. J. (2020). Microcarriers for upscaling cultured meat production. *Frontiers in Nutrition*, 7, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00010>

Bogliotti, Y. S., Wu, J., Vilarino, M., Okamura, D., Soto, D. A., Zhong, C., Sakurai, M., . . . Juan Ross, P. (2018). Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(9), 2090-2095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115>

Braga, M., Simmons, Z., Norris, K. C., Ferrini, M. G. & Artaza, J. N. (2017). Vitamin D induces myogenic differentiation in skeletal muscle derived stem cells. *Endocrine Connections*, 6(3), 139-150. <https://doi.org/10.1530/ec-17-0008>

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1. Recuperado de <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf>

Burattini, S., Ferri, P., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., & Falcieri, E. (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*, 48(3), 223-233.

Burton, N. M., Vierck, J., Krabbenhoft, L., Byrne, K., & Dodson, M. V. (2000). Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions. *Methods in Cell Science*, 22(1), 51-61. <https://doi.org/10.1023/A:1009830114804>

Chiron, S., Tomczak, C., Duperray, A., Lainé, J., Bonne, G., Eder, A., Hansen, A., . . . Coirault, C. (2012). Complex interactions between human myoblasts and the surrounding 3D fibrin-based matrix. *PLoS ONE*, 7(4), e36173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036173>

Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., . . . Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. (2005). Guidance on good cell culture practice: A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *ATLA*, 33(3), 261-287. <https://doi.org/10.1177/026119290503300313>

Dong, C., & Lv, Y. (2016). Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers*, 8(2), 42. <https://doi.org/10.3390/polym8020042>

Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A Review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>

Feist, A. M., & Palsson, B. O. (2016). What do cells actually want? *Genome Biology*, 17(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0983-3>

Gillispie, G. J., Park, J., Copus, J. S., Asari, A. K. P. R., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2019). Three-dimensional tissue and organ printing in regenerative medicine. In A. Atala, R. Lanza, A. G. Mikos & R. Nerem (Eds.), *Principles of Regenerative Medicine* (3a ed., pp. 831-852). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00047-3>

Girón-Calle, J., Vioque, J., Pedroche, J., Alaiz, M., Yust, M. M., Megías, C., & Millán, F. (2008). Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology*, 57(3), 263-272. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9170-z>

Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(7), 1-21. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>

Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2015). Induced pluripotency and epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a019448. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019448>

Hu, W. S. (2020). *Cell culture bioprocess engineering* (2a ed). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429162770>

Huang, Y., Liang, P., Liu, D., Huang, J., & Songyang, Z. (2014). Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein & Cell*, 5(3), 194-202. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0028-1>

Jamal, P., Alam, M. Z., & Salleh, N. U. (2008). Media optimization for bioproteins production from cheaper carbon source. *Journal of Engineering Science and Technology*, 3(2), 124-130.

Jochems, C. E., van der Valk, J. B., Stafleu, F. R., & Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *ATLA*, 30(2), 219-227. <https://doi.org/10.1177/026119290203000208>

Jones, J. D., Rebello, A.S., & Gaudette, G. R. (2021). Decellularized spinach: An edible scaffold for laboratory-grown meat. *Food Bioscience*, 41(2-3), 100986. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100986>

Kanatous, S. B., & Mammen, P. P. (2010). Regulation of myoglobin expression. *The Journal of Experimental Biology*, 213(Pt 16), 2741-2747. <https://doi.org/10.1242/jeb.041442>

Kim, S. K. (2013). *Marine proteins and peptides: Biological activities and applications*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118375082>

Kyttälä, A., Moraghebi, R., Valensisi, C., Kettunen, J., Andrus, C., Pasumarthi, K. K., Nakanishi, M., . . . Trokovic, R. (2016). Genetic variability overrides the impact of parental cell type and determines iPSC differentiation potential. *Stem Cell Reports*, 6(2), 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.12.009>

Lee, N., Shin, J., Park, J. H., Lee, G. M., Cho, S., & Cho, B. K. (2016). Targeted gene deletion using DNA-free RNA-guided Cas9 nuclease accelerates adaptation of CHO cells to suspension culture. *ACS Synthetic Biology*, 5(11), 1211-1219. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00249>

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34(4), 422-434 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>

Matassa, S., Verstraete, W., Pikaar, I., & Boon, N. (2016). Autotrophic nitrogen assimilation and carbon capture for microbial protein production by a novel enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria. *Water Research*, 101, 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.077>

O'Neill, E. N., Cosenza, Z. A., Baar, K., & Block, D. E. (2021). Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 686-709. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12678>

Ong, K. J., Johnston, J., Datar, I., Sewalt, V., Holmes, D., & Shatkin, J. A. (2021). Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5421-5448.

Porto, L. M., & Berti, F. V. (2022). *Carne cultivada: Perspectivas e oportunidades para o Brasil*. Tiki Books; The Good Food Institute Brasil. http://doi.org/10.22491/carne_cultivada

Post, M.J., Levenberg, S., Kaplan, D.L, Genovese, N., Fu, J., Bryant, C. J., Negowetti, N., . . . Moutsatsou, P. (2020). Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nature Food*, 1, 403-415. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0112-z>

Ramboer, E., De Craene, B., De Kock, J., Vanhaecke, T., Berx, G., Rogiers, V., & Vinken, M. (2014). Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 61(4), 925-943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.046>

Reiss, J., Robertson, S., & Suzuki, M. (2021). Cell sources for cultivated meat: Applications and considerations throughout the reduction workflow. *International Journal of Molecular Science*, 22(14), 7513. <https://doi.org/10.3390/ijms22147513>

Shiozuka, M., & Kimura, I. (2000). Improved serum-free defined medium for proliferation and differentiation of chick primary myogenic cells. *Zoological Science*, 17(2), 201-207. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.201>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., . . . Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053-1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>

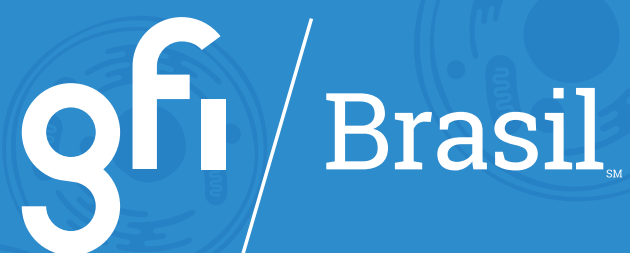
Wosczyzna, M. N., & Rando, T. A. (2018). A Muscle stem cell support group: Coordinated cellular responses in muscle regeneration. *Developmental Cell*, 46(2), 135-143 <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.018>

Wu, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2015). Dynamic pluripotent stem cell states and their applications. *Cell Stem Cell*, 17(5), 509-525. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.10.009>

Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 99-117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>.

The Good Food Institute Brasil

Alexandre Cabral	<i>Vice-presidente de Políticas Públicas</i>
Alysson Soares	<i>Especialista de Políticas Públicas</i>
Amanda Leitolis	<i>Especialista de Ciência e Tecnologia</i>
Ana Carolina Rossettini	<i>Gerente de Desenvolvimento</i>
Ana Paula Rossettini	<i>Analista de Recursos Humanos</i>
Camila Lupetti	<i>Especialista de Engajamento Corporativo</i>
Camila do Nascimento	<i>Analista de Finanças e Operações</i>
Cristiana Ambiel	<i>Gerente de Ciência e Tecnologia</i>
Fabio Cardoso	<i>Analista de Comunicação</i>
Guilherme de Oliveira Vilela	<i>Especialista de Engajamento Corporativo</i>
Gustavo Guadagnini	<i>Presidente</i>
Isabela Pereira	<i>Analista de Ciência e Tecnologia</i>
Jaqueline Gusmão	<i>Assistente Executiva</i>
Karine Seibel	<i>Gerente de Operações e Recursos Humanos</i>
Katherine de Matos	<i>Vice-presidente de Ciência e Tecnologia</i>
Lorena Pinho	<i>Analista de Ciência e Tecnologia</i>
Luciana Fontinelle	<i>Especialista de Ciência e Tecnologia</i>
Mariana Bernal	<i>Analista de Políticas Públicas</i>
Mariana Demarco	<i>Analista de Ciência e Tecnologia</i>
Raquel Casselli	<i>Diretora de Engajamento Corporativo</i>
Vinícius Gallon	<i>Especialista de Comunicação</i>



WWW.GFI.ORG.BR



GFIBR@GFI.ORG

in

