INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY
DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA

Diseño de un bioreactor de agitación excéntrica con potencial aplicación en el cultivo de células de mamífero.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

POR:

MARÍA IRENE SÁNCHEZ CERVANTES

MONTERREY, N.L. ABRIL 2005

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERÍA

Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por la Ing. Ma. Irene Sánchez Cervantes sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias con especialidad en:

BIOTECNOLOGÍA

Comité de Tesis

Dr. Mario M. Álvarez Asesor	Dr. Jorge E. Moreno Asesor
M.C. Juan Gerardo Cantú Sinodal	Dr. Joaquín Acevedo Sinodal

Aprobado:

Dr. Federico Viramontes Brown
Director del Programa de Graduados en Ingeniería

Abril 2005

Índice

Índice

Lista de tablas **i**

Lista de figuras **ii**

Lista de abreviaturas **v**

Resumen **1**

Capítulo I. Antecedentes

1.1 Ingeniería de bioprocesos como “cuello de botella” en biotecnología 4

1.2 Bioreactores 4

1.2.1 Funciones de un bioreactor 6

1.2.2 Diferencias entre el crecimiento en placa con agar y un bioreactor 7

1.2.3 Bioreactores utilizados en la actualidad 9

1.2.4 Flujo laminar 11

1.2.5 Mezclado y sus estudios en tanques agitados 11

1.2.6 Tanques agitados concéntricos 12

1.2.7 Bioreactores excéntricos 13

1.3 Aportación experimental del presente trabajo 14

Capítulo II. Introducción

2.1 Justificación de la investigación 16

2.2 Objetivo general 16

2.3 Objetivos específicos 16

2.4 Hipóteis 17

Capítulo III. Parte Experimental.

3.1 Material y equipo 19

3.2 Diseño del bioreactor de 1 L. 19

3.3 Caracterización del bioreactor celular 24

3.3.1 Preparación de la solución de Glicerina-Fluoresceína 24

3.3.2 Visualización de patrones de mezclado 25

Capítulo IV. Resultados y Discusiones

4.1 Optimización de la fórmula de la mezcla Glicerina-Fluoresceina-Agua (GFA) 29

4.2 Caracterización del bioreactor celular 30

4.2.1 Sistemas concéntricos (caso base) 31

4.2.2 Sistemas excéntricos (E=0.21) 37

4.2.3 Sistemas excéntricos II (E = 0.42) 43

4.2.4. Comparación de sistemas 49

Capítulo V. Conclusiones 52

Capítulo VI. Bibliografía 55

Lista de tablas

Tabla 1. Funciones de un reactor biológico 7

Tabla 2. Parámetros necesarios para el cultivo de células animales 7

Tabla 3. Bioreactores y alternativas actuales para crecimiento de células de mamífero 10

Tabla 4. Régimenes de flujo en base al número de Reynolds 11

Tabla 5. Material, equipo y reactivos/sustancias 19

Tabla 6. Pruebas para la elaboración del trazador fluorescente 24

Tabla 7. Pruebas de inyección de GFA 24

Tabla 8. Parámetros establecidos para el análisis de mezclado 26

Tabla 9. Resultados experimentales obtenidos con el reactor en su configuración concéntrica 37

Tabla 10. Experimentos con el reactor a una excentricidad de 0.21 43

Tabla 11. Experimentos con el reactor a una excentricidad de 0.42 49

Tabla 12 Comparación de las condiciones óptimas en cada posición del eje . 50

Lista de figuras

Fig. 1. Impulsor tipo “Rushton” 5

Fig. 2. Impulsor de tipo axial 5

Fig. 3. Impulsor tipo disco sin paletas 5

Fig. 4. Prototipo de bioreactor celular de 1 L 21

Fig. 5. Electrodos del BioFlo III (New Brunswick Scientific®) [(a) D.O. (b) pH] 22

Fig. 6. Tapa del bioreactor prototipo. [(1) Excentricidades (E). (a) E=0.42 a 2.25 cm del centro; (b) E=0.21 a 1.25 cm del centro; (c) E=0.00 concéntrico. (2) Fotografía de la tapa del bioreactor] 22

Fig. 7. Equipo de agitación. [(a) Propelas de (1) ∅=3cm y (2) ∅=5cm. (b) Eje o varilla de agitación con los impulsores] 23

Fig. 8. Fermentador de New Brunswick Scientific®, Edison, NJ, USA. 23

Fig. 9. Diagrama de proceso. [(1) Pesado de la fluoresceína. (2) Preparación de GFA. (3) Pipeteo de 3 ml de GFA. (4) Inyección del GFA al bioreactor. (5) Operación del bioreactor celular y toma de fotografía usando luz UV] 27

Fig. 10. Patrones de mezclado 30

Fig. 11. Separatrices en tanques concéntricos. [(a) Inyección de fluoresceína en un sistema con disco ∅=3cm. mostrando separatriz marcada desde el momento de la inyección. (b) Persistencia de la separatriz después de 30 min de agitación a 300 rpm] 33

Fig. 12. Zonas segregadas en sistemas concéntricos al término de 1 hr. con disco de diámetro de 5 cm 34

Fig. 13. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor concéntrico a 300 rpm y disco de 5 cm. [(a) 1.15 min; (b) 3 min; (c) 10 min; (d) 20 min; (e) 60 min 35

Fig. 14. Aro de trazador fluorescente que no logra mezclarse. [(a) Zona de mezclado donde las 2 sustancias fluorescentes no logran mezclarse. Arratia *et al.*, 2002. (b) Sistema concéntrico a 500 rpm] 36

Fig. 15. Zonas segregadas en un reactor excéntrico a diferentes tiempos según Rivera et al, 2004 38

Fig. 16. Zonas segregadas en sistemas E = 0.21, $\varnothing_{disco}$ = 5 cm. t = 60 min. 40

Fig. 17. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor con excentricidad de 0.21 a 500 rpm y disco de 3 cm. [(a) 20 min; (b) 30 min; (c) 60 min] 41

Fig. 18. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor con excentricidad de 0.21 a 300 rpm y disco de 5 cm. [(a) 45 seg; (b) 1 min; (c) 1.75 min; (d) 5 min; (e) 30 min] 42

Fig. 19. Barrera existente en sistemas E = 0.42, $\varnothing_{disco}$ = 5cm, *v* = 500 rpm. 45

Fig. 20. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor con excentricidad de 0.42 a 500 rpm y disco de 5 cm. [(a) 45 seg; (b) 1 min 45 seg; (c) 5 min]. 46

Fig. 21. Destrucción de zonas segregadas en sistemas excéntricos (*t = 8 min,, v = 300 rpm,* $\varnothing_{disco}$ *=3 cm)* 47

Fig. 22. Comparación del comportamiento a los 15 seg. en un [(a) sistema excéntrico E = 0.42 vs un (b) sistema concéntrico]. 48

Fig. 23. Comparación del mezclado final en diferentes pruebas. [(a) $\varnothing_{disco}$=3cm, E=0.42, *v*=500rpm. (b) $\varnothing_{disco}$=5cm, E=0.0, *v*=500rpm. (c) $\varnothing_{disco}$=5cm, E=0.21, *v*=300rpm]. 51

Lista de abreviaturas

∅	Diámetro
ρ	Densidad
μ	Viscosidad
ºC	Grados Centígrados
%	Porcentaje
Cap	Capacidad
cm	centímetros
CO_2	Bióxido de Carbono
D	Diámetro del impulsor
D.O.	Oxígeno Disuelto
E	Excentricidad
Etc	Etcétera
Fig	Figura
g	gramos
GFA	Glicerina:Fluoeresceína:AguaBidestilada
Hr	Hora(s)
IQ	Ingeniería Química

ITESM	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
L	Litros
L/D	Relación de Largo por Diámetro
Mex	México
ml	Mililitros
min	Minutos
MTY	Monterrey
N_2	Nitrógeno
N, *v*	Velocidad
N.L.	Nuevo León
No.	Número
Re	Número de Reynolds
seg	segundos
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultra Violeta
Vaso pp	Vaso de precipitados

DEDICATORIA

A Dios por llevarme siempre de su mano.

A mis papás por darme las bases y el ejemplo para poder llegar a donde estoy y por impulsarme a siempre seguir adelante. Los amo!.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todos los regalos y bendiciones con los que me ha llenado desde el día que me dio la vida.

A mis papás por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y apoyarme en mis decisiones (aun y cuando discutamos por ello). Y sobre todo gracias por tratar de ser el mejor ejemplo para nosotros, sus hijos.

A mis niños, Pauli y Cristy, por ser como son, por colocar una sonrisa siempre que hablaba con ustedes o iba a la casa. Los amo! Y son mi mayor orgullo.

A mi familia completa, tíos, abuelitos, primos, por su apoyo incondicional y cariño.

A mis asesor, Dr. Mario, y mis sinodales, Dr. Jorge, MC. Juan Gerardo y Dr. Acevedo por su ayuda y dedicación en este proceso tan importante para mí, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A Gerardo por ser mi mayor soporte tanto escolar como personal… tqm amiguito! y nunca te voy a olvidar.

A Jessi, Ofe, Benito, Moni, Vale, Sel y mis niñas de la calle Santa Barbara (Martita, Luz, Nora, Las Pollas, Dore, Francia, Rox, Isa) por ser mi familia en esta gran Ciudad!... siempre estarán en mi corazón Hermanitas!, bueno y un hermanito!.

A Dulce, Bere, Cyn, Perla, Chio, Sheeyron, Judy y Ari por ser mis grandes amigas, por enseñarme el valor de la amistad a través de los tiempos y que la distancia entre las personas no existe porque siempre estuvieron, están y estarán conmigo.

A Raulito, Martell, Paquito y David por ser mis fantasticos!, por ser mis defensores en todo momento, por sus regaños y por todas esas lecciones de vida que me hacen más fuerte y mil gracias por siempre tenerme presente. Los adoro!.

A Almis, Dorita, Sandy, Tania y Jobo, por ser mi ejemplo de trabajo, de vida y de hermandad. Los quiero bastante!!!

A Memo, Carlos, Yajis, Yadhi, Gaby, Geno, Beto, Tavo, Ira, Jane y Fer por compartir conmigo sus conocimientos en el labo y por ofrecerme su amistad. Consideren que esto es recíproco. Gracias por todo!.

A mis compañeros de maestría por haber formado parte de mi desarrollo personal y profesional a lo largo de estos 2 años en el ITESM.

A mis niños Bolivianos (Fernando, Carlitos, Andreas, Javi) por su amistad y por enseñarme a querer otro país, a valorar otra cultura y por ende aprender a querer más la mía.

A los niños de la SAGRI (Fer, Ro y Joaquin) por su amistad invaluable y por esos grandes consejos.

RESUMEN

El cultivo de células de mamífero en bioreactores es un reto tecnológico vigente. Las células de mamífero son significativamente más sensibles al estrés mecánico que las células bacterianas. Las configuraciones actuales de bioreactores pueden ocasionar daño celular por los niveles de estrés mecánico propios a su operación. Investigaciones previas demuestran que la simple modificación de desplazar el eje de agitación en un tanque, de la posición central a una excéntrica, generan cambios dramáticos en los patrones de flujo y mejoras significativas en el mezclado. Esta investigación amplía la ventana de condiciones experimentales contemplada en investigaciones anteriores, y documenta la sustitución de propelas convencionales por el uso de agitadores de bajo estrés mecánico (se probaron dos distintos diámetros de discos sin paletas) como alternativa de uso para bioreactores para células de mamífero.

Se realizaron experimentos de visualización de patrones de mezclado en sistemas laminares concéntricos y excéntricos. Las pruebas se efectuaron en un bioreactor de 1 L., utilizando glicerina como sustancia base y un trazador fluorescente de fluoresceína para marcar los patrones de flujo. Se hicieron estudios en cada una de las posiciones del eje (E=0.00, 0.21, 0.42) a 3 diferentes velocidades (v=150, 300, 500 rpm) y con cada uno de los discos (∅=3,5 cm), por periodos de evaluación de una hora. En el caso base, la configuración concéntrica, (E=0.00) con ambos discos se observa la presencia de regiones toroidales segregadas arriba y debajo del impulsor, sin importar la velocidad de agitación. Estas regiones sobreviven al proceso de mezclado por tiempos superiores a una hora. En el caso de E=0.21, para ambos discos; el tiempo de mezclado disminuye, las regiones toroidales segregadas se reducen, pero aún siguen existiendo, adquiriendo cierta asimetría, aunque su ubicación no varía significativamente con respecto al caso base. En E=0.42, el tiempo de mezclado se reduce considerablemente. A 500 rpm y utilizando un impulsor de

3cm, se obtiene un mezclado homogéneo, sin presencia de zonas segregadas, en un tiempo de 6 min.

Este trabajo demuestra que un sistema excéntrico de E=0.42, con un impulsor de disco de 3 cm. exhibe buen desempeño de mezclado a bajas velocidades. Se sugiere dicha configuración para su empleo en el cultivo de células susceptibles a estrés mecánico. La validación de esta aplicación recaerá en investigaciones posteriores.

CAPÍTULO I.

ANTECEDENTES

1.1 Ingeniería de bioprocesos como “cuello de botella” en biotecnología

El número creciente de microorganismos que están siendo utilizados en actividades relacionadas con la ingeniería genética, biomédica, biotecnológica y por la medicina en aplicaciones terapéuticas, farmacológicas y clínicas hacen que el desarrollo de nuevas tecnologías para el cultivo celular esté en continua evolución. Reportes de nuevas biotransformaciones son sumamente comunes en nuestros días. Sin embargo, el conocimiento insuficiente en el área de la ingeniería de bio-procesos es un importante cuello de botella en el mejoramiento y escalamiento de los mismos (Chisti, M.Y, 1989).

1.2 Bioreactores

Un bioreactor está conformado principalmente por una jarra ó contenedor, un eje/varilla de agitación, impulsores (puede tener más de uno), una tapa hermética, puertos de entrada para electrodos (pH, temperatura, DO), un rotor para poder llevar a cabo la agitación, una o varias salidas o puertos de muestreo y sistemas periféricos para poder regular la inyección de ácido, base, nutrientes y antiespumantes. (Schürgel, K., 1990; Ward, O.P, 1991)

Diversos tipos de bioreactores son utilizados en procesos biotecnológicos (Shürgel, K., 1990; Levenspiel, O., 1998; Rodríguez, A.C., *in press*). Entre ellos hay variaciones geométricas importantes. En términos muy genéricos, dos son las geometrías predominantes en el diseño de reactores biológicos: reactores tubulares “t” y reactores tipo tanque. De estos, los reactores tipo tanque son los más frecuentemente utilizados en escala laboratorio, piloto, e industrial. Existen sin

embargo, variaciones geométricas dentro del grupo de los reactores tipo tanque: geometría de sus agitadores (impulsor tipo “Rushton” de 6 aspas (Fig. 1), impulsor axial (Fig. 2) e impulsor/propela de disco plano sin paletas (Fig. 3)), número de agitadores (uno y tres dispuestos al centro del tanque son las configuraciones más frecuentes), espaciamiento entre impulsores, relación altura/diámetro del tanque (relación L/D).

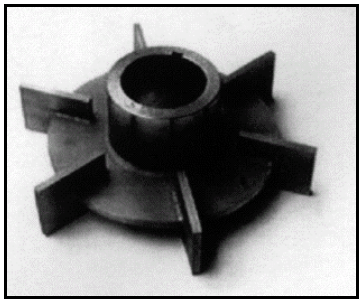


Fig. 1. Impulsor tipo “Rushton”. (tomado de Vrábel *et al. 2000)*

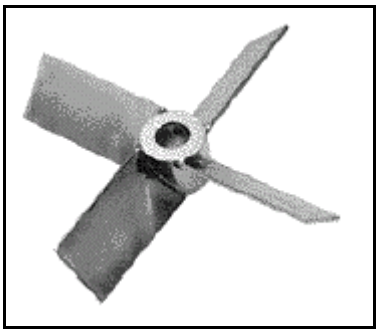


Fig. 2. Impulsor de tipo Axial.

Fig. 3. Impulsor tipo disco sin paletas

1.2.1 Funciones de un Bioreactor

Un bioreactor es un aparato en donde se llevan a cabo reacciones biológicas tales como fermentaciones, producción de medicamentos, productos químicos de alto valor, entre otros.

Actualmente, se utilizan en el crecimiento de células de mamífero y plantas con la finalidad de ayudar en tratamientos y en posibles terapias para enfermedades como el cáncer, aterosclerosis, aterotrombosis, etc (Schindhelm *et al*., 1999).

Las funciones primordiales de un bioreactor para cultivo celular se especifican en la Tabla 1. En el contexto de cultivo de células animales, de particular interés en este trabajo, el adecuado control de parámetros de cultivo celular resulta crucial dadas las condiciones especiales que la células animales necesitan para su crecimiento (Tabla 2). Otros aspectos importantes a considerar en el manejo de un sistema de cultivo celular son la completa esterilidad de la jarra e instrumentos del bioreactor y el control de la velocidad de agitación. Las células de mamífero son más susceptibles al estrés mecánico en comparación con bacterias y hongos. Para su cultivo se recomiendan condiciones benignas de agitación (Curran, S.J., *et al*, 2004; Chattopadhyay, S., *et al*, 2001), aunque aún existe controversia sobre el umbral de tolerancia a la turbulencia por parte de estas células. Existen reportes de diversos tipos de células de mamífero que son cultivadas en bioreactor (CHO, Vero, etc) y en

los cuáles para su crecimiento se agitan a bajas velocidades, es decir en un régimen laminar (90 – 300 rpm), por lo que se comprueba que se necesitan condiciones mínimas de agitación.

Tabla 1. Funciones de un Reactor Biológico.

Función	
Contenedor	Asegurar la contención y esterilidad de su contenido
Introducción de sustratos gaseosos	O_2, CO_2, N_2
Introducción de nutrientes	Fuentes de carbono
Remoción de productos gaseosos	CO_2, CH_4
Control de ambiente físico	Temperatura, Condiciones de mezclado, pH
Suspensión de materiales	Células, acarreadores, partículas
Dispersión	Sistema de dos o tres fases

Fuente: Scale-up of Bioprocess. Cap. 11. NV&L. (Tabla Modificada)

Tabla 2. Parámetros necesarios para el cultivo de células animales

Parámetro	Condiciones
Temperatura	37 ºC
CO_2	5-10%
Volumen de trabajo	1,000 – 10,000 ml
Tiempo de cultivo	6 – 21 días

Fuente: Lettenbauer, C., *et al*. (*en impresión).* Suiza.

1.2.2 Diferencias entre el crecimiento en placa con agar y un bioreactor

Existen dos grandes clases de sistemas de producción de células de mamífero: sistemas de cultivo en placa o en botellas, y sistemas de cultivo en bioreactores (mayoritariamente tanques agitados). Algunas instituciones y compañías industriales y de investigación siguen utilizando sistemas de placas o botellas de cultivo celular; sin embargo estas presentan muchas limitantes, entre las cuales se encuentran:

(a) Volumen y escala. Los sistemas de botellas y cajas no son escalables por volumen, solo por número (no se diseña una "caja Petri gigante", se utilizan más cajas). Entonces, el costo a la larga se incrementa, ya que no solo se necesitan "n" número de cajas/botellas de crecimiento celular, pipetas, y medio de cultivo, sino mayor número de incubadoras, que al crecer en volumen muchas veces son incrementalmente ineficientes y costosas.

(b) Condiciones de esterilidad. La esterilización de los materiales (pipetas, frascos de transferencia, etc.) implica mucha manipulación de los mismos. Adicionalmente, el abrir y cerrar las incubadoras para realizar los cambios de medio que las células necesitan, deja la posible contaminación de las células que en ella se contienen.

(c) Tiempo de crecimiento y duplicación celular. El tiempo de crecimiento en sistemas placa o botellas de cultivo es alto, por lo que alcanzar un número considerable de células por medio de crecimiento en placa implica un tiempo prolongado.

Las limitaciones y/o características anteriormente mencionadas se ven reducidas o eliminadas si se encuentra un sistema de crecimiento adecuado en un bioreactor escalable en volumen, que soporte crecimiento masivo de células en suspensión. Sin embargo, la mayor parte de los bioreactores actulamente utilizados para cultivo de células de mamífero en suspensión, fueron modificados a partir de diseños de sistemas tanque utilizados para cultivo bacteriano y por lo tanto su

eficiencia o productividad pudiera ser cuestionable. Citando un aspecto relevante, el mecanismo de mezclado prevalente en bioreactores tipo tanque para cultivo celular es la turbulencia. Esto implica condiciones extremas de estrés mecánico por agitación que realmente no son necesarias y además pudiesen ser causales de daño celular (Cherry *et al*, 1988; Shane *et al*, 1987).

1.2.3 Bioreactores utilizados en la actualidad.

Son pocos los sistemas de bioreactor utilizados para el crecimiento de células de mamífero. Sin embargo, compañías como New Brunswik Scientific, o Bellco Biotechnolgy fabrican diversos equipos para este fin. Adicionalmente, existen alternativas tecnológicas para el crecimiento celular como lo es el uso de membranas que protejan a la célula contra el estrés mecánico que pudiera sufrir en un bioreactor. En la Tabla 3 se muestran ejemplos de bioreactores de células de mamífero con sus características generales.

Tabla 3. Bioreactores y alternativas actuales para crecimiento de celulas de mamífero

Compañía	Equipo	Descripción
New Brunswick Scientific	BioFlo 3000[1]	• Fermentador autoclave y bioreactor • Ideal para líneas celulares de animales, insectos y plantas • Sistema tipo tanque agitado • Impeler tipo "Rushton" de 6 paletas • Capacidad: Jarras intercambiables de 1.6 a 14 L. • Lecho empacado con Fibra-Cel®
New Brunswick Scientific	BioFlo 110[1]	• Crecimiento de todo tipo de células, desde microorganismos aeróbicos y anaerobios hasta levaduras, células de insectos, plantas y mamíferos. • Jarras de 1.3, 3.0, 7.5 y 14.0L. • Sistema semi-automatizado • Impulsor tipo "Rushton", impulsores axiales. (intercambiables)
Bellco Biotechnology	Bioreactor 3 y 7L.[2]	• Diseñado para cultivo bacteriano y células de mamífero. • Jarra de borosilicato • Entradas y salidas para pH, Do, temperatura y agitación (rpm). • Impeler de disco vertical
Investigadores del Instituto Federal Suizo de Tecnología y del Instituto Universitario de Tecnología de Francia	CellMAC[3]	• Encapsulación de células de mamífero en cápsulas de sulfato de celulosa/pDADMAC. • Protección de la célula de mamífero en cuanto al estrés mecánico que sufre en régimen turbulento

1. www.nbsc.com 2. www.bellcoglass.com 3. Weber *et al.*, 2004.

1.2.4 Flujo laminar

Cuando un fluido circula por un tubo pueden encontrarse diferentes regimenes de circulación en función del número de Reynolds. Éste se define como

$$\boxed{\mathrm{Re} = \frac{\rho D \upsilon}{\mu} = \frac{\rho D^2 N}{\mu}}$$

en donde ρ es la densidad del fluido, D el diámetro del impulsor, N la velocidad en rpm y μ la viscosidad. Los regimenes de flujo en un tanque agitado son los presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Regimenes de flujo en base al Número de Reynolds

Régimen	Rango
Laminar	Re ≤ 2.100
Transición	2.100 < Re < 10.000
Turbulento	Re ≥ 10.000

Fuente: Santamaría *et al*., 1999.

Para efectos prácticos se puede considerar que para un Re ≥ 4.000 ya existe un flujo turbulento en un tanque agitado (Santamaría *et al*., 1999).

Existen reportes de sistemas laminares tipo tanque (Alvarez, 2000; Alvarez *et al*, 2002) que asegurarían mezclado apropiado a menor estrés mecánico.

1.2.5 Mezclado y su estudio en tanques agitados.

Un bioreactor, como ya se ha mencionado, tiene diferentes funciones, dentro de las cuales se encuentra el mezclado, sin embargo es una de las menos estudiadas,

como se puede observar en la tabla 1 ni siquiera es mencionada, aun y cuando es una de las prácticas tecnológicas más antiguas (Álvarez *et al*, 2002). El mezclar implica lograr una uniformidad en todos los componentes que se encuentran contenidos en un bioreactor. Los procesos de mezclado son practicados desde el Paleolítico, cuando los pintores de las cavernas mezclaban hollín y ocre con el jugo y la grasa de animales (Graziosi, 1960). Actualmente, se reconoce la importancia de un adecuado mezclado en la industria alimentaria, farmacéutica y química. Los tanques agitados son los sistemas de agitación industrial más usados en procesos químicos: manufactura de detergentes, cremas, medicinas, alimentos, vacunas y químicos en general (Chisti, M.Y., 1989). Estos tanques cuentan con sistemas de agitación con impulsores de tipo radial (generalmente impulsores Rushton) o de tipo axial. Los métodos cuantitativos que describen el mezclado en tanques agitados son generalmente limitados y el diagnóstico de condiciones de mezclado regularmente se hace en base a experimentos de neutralización (Hayes *et al*, 1998; Norwood *et al*, 1960) o midiendo tiempos basados en la variación de pH o conductividad (Kramers *et al*, 1953; Biggs, 1963). El estudio del mezclado en el contexto de diseño de bioreactores es incipiente (Álvarez *et al*, 2004), y los diseños alternativos a equipo convencional no son frecuentes. Por ejemplo, los discos, en arreglos simétricos ó asimétricos, no son encontrados en la práctica industrial (Álvarez *et al*, 2002).

1.2.6 Tanques agitados concéntricos

Los bioreactores concéntricos son los más estudiados, actualmente son los que se utilizan en la mayoría de los procesos para producción de fármacos, alimentos y crecimiento celular. Los sistemas simétricos son mecánicamente más estables cuando se requiere trabajar en régimen turbulento. Sin embargo, la simetría induce a serias patologías de mezclado en el régimen laminar, como lo indican Lamberto *et al*, (1996) y Alvarez *et al*, (2002). En los experimentos recientemente reportados por Alvarez *et al*, 2004, se observaron diversos problemas típicos de geometrías concéntricas: separatrices horizontales, presencia de zonas segregadas y deficiencias

en mezclado vertical. Las separatrices y regiones segregadas han sido identificadas en sistemas tipo tanque laminares agitados con propelas “Rushton” y axiales. Si una propela de este tipo fuera reemplazada por un disco de un mismo diámetro, se originaría un flujo muy similar (en sistema concéntrico), pero esencialmente no ocurriría un mezclado convectivo, pues el sistema no sería caótico (Álvarez *et al.*, 2002). Con las propelas “Rushton” se obtiene un mezclado más eficiente que con el disco, debido a que se produce caos más generalizado con las primeras. Aunado a esto una agitación más agresiva.

En consecuencia, un bioreactor tipo tanque concéntrico operado en flujo laminar presentaría patologías de mezclado. Idealmente, un sistema con impulsores que originen bajo estrés mecánico y que aún promueva mezclado adecuado en flujo laminar, tendría alto potencial de aplicación como bioreactor para cultivo de células de mamífero.

1.2.7 Bioreactores Excéntricos

El objetivo último de un sistema excéntrico de agitación es crear un sistema caótico, que distribuya de una forma “aparentemente azarosa” a las partículas del fluido, destruyendo la segregación inicial. En la actualidad, los sistemas excéntricos solo son recomendados como una alternativa al uso de baffles, para minimizar la formación de vortex en aplicaciones turbulentas. Su presencia en la escala industrial es mínima y se restringe generalmente a escalas pequeñas. Joosten *et al.* (1977) recomienda utilizar arreglos asimétricos de baffles para alcanzar a suspender partículas a bajos valores de revoluciones por minuto (RPM) creando un vortex excéntrico similar al que promovería un sistema de agitación excéntrica. Esta sugerencia, no ha sido explorada industrialmente. Fountain *et al*, (1998) documenta experimentos en un tanque agitado en donde se montó un disco en un eje inclinado, esto también a régimen laminar. Los autores reportan generación de caos parcial para flujos lentos de fluidos newtonianos. En un estudio más reciente en tanques

excéntricos realizado por Álvarez *et al*., (2002), se prueban algunos valores de excentricidad, capaces de originar caos ampliamente distribuido en el sistema, observándose una reducción significativa del tiempo de mezclado con respecto a sistemas concéntricos para valores de Re menores a 50. Estos resultados fueron recavados de forma visual, utilizando inyecciones de trazadores fluorescentes. Esta misma técnica fue utilizada en este estudio.

En el trabajo de Alvarez (2000) y Alvarez *et al*, (2002) se utilizó un tanque cilíndrico de diámetro de 12.06 cm. con depresiones cónicas al fondo localizadas a 0, 2.54, 5.082 y 7.623 cm del centro. La excentricidad del sistema se define como $E = \beta/\alpha$, donde α es el radio del tanque, β la distancia del eje al centro y E excentricidad. Así, las excentricidades utilizadas son 0.21, 0.42 y 0.43. Se usaron 3 tipos de impulsores: axial ("Pitch impeller"), turbina Rushton y un disco de acrílico sin hojas. La mezcla de glicerina y agua utilizada como fluido de trabajo exhibió un rango de viscosidad entre 500 y 800 centipoises. Se exploró el rango de velocidades moderadas (50 – 300 rpm), resultando estas condiciones en un rango de flujos laminares (Re = 12.5 – 50). En esta investigación, solo se presenta una imagen del patrón de mezclado con disco sin paletas en una excentricidad de 0.42, sin embargo, no reporta tiempos precisos de mezclado y carece de información con respecto al mezclado en sistema concéntrico y de excentricidad 0.21 con el impulsor anteriormente mencionado.

1.3. Aportación experimental del presente trabajo

En esta investigación, la configuración de tanque concéntrica se tomo como caso base de comparación contra configuraciones excéntrica. Adicionalmente, se documentó el uso de impulsores de disco (sin paletas), como una alternativa a impulsores radiales o axiales que son causales de campos de estrés mecánico más concentrados y agresivos. Los parámetros a evaluar son la velocidad de agitación, el

número de Reynolds, tiempo inicial y total de mezclado, diámetro de disco, presencia de zonas segregadas y separatrices dentro del área de mezclado.

CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN

2.1 Justificación de la investigación

Los bioreactores prevalentes para el cultivo de células de mamífero no fueron diseñados para tal propósito. Su geometría, ha sido básicamente inspirada de aquella utilizada en el cultivo de bacterias y levaduras. Las células bacterianas son, sin embargo, altamente resistentes al estrés mecánico. Esta característica no es compartida por las células de mamífero. Siendo cada vez más frecuente la necesidad industrial de cultivar células de mamífero o insecto dado el potencial de éstas como vectores para la producción de biofármacos, es relevante optimizar el diseño de los bioreactores que actualmente se utiliza a fin de mezclar eficientemente impartiendo el menor estrés mecánico posible a las células.

2.2 Objetivo General

Proponer un diseño innovador de bioreactor para crecimiento celular donde las condiciones de mezclado (en régimen laminar) sean las óptimas [$v_{\text{agitación}}$ baja (flujo laminar), t_{mezclado} menor a una hora y mezclado más homogéneo (disminución de zonas segregadas y regiones segregadas)]

2.3 Objetivos Específicos

- Estandarizar un método de estudio de patrones de mezclado en tanques vía inyección de trazadores fluorescentes
- Diseñar y construir un bioreactor prototipo de 1L para este estudio, pero utilizable para experimentos utilizando material celular.
- Validar los patrones de flujo en un bioreactor concéntrico.
- Comparar los patrones de flujo observables en configuraciones concéntricas y excéntricas.

2.4 Hipótesis

Un reactor de configuración excéntrica puede crear condiciones de mezclado adecuadas para el crecimiento de células de mamífero, a muy bajas velocidades de agitación y de generación de estrés mecánico.

CAPÍTULO III.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material y Equipo

Para la realización de la parte experimental de este proyecto se utilizaron los instrumentos, materiales y reactivos referidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Material, Equipos y Reactivos/Sustancias.

	Descripción
Equipo	• Fermentador BIOFLO III. *New Brunswik Scientific*. Capacidad 5L. • Bioreactor para cultivo cellular de 1 L. • Pipetor *Glasfirm.* Pi.pump 2500 • Balanza granataria *Ohaus* • Cámara Fotográfica *Pentax* K1000. • Tripie para cámara fotrográfica • Lámpara de luz UV. *Spectroline*. Modelo B-160. Longitud de onda: 365 nm. USA.
Material	• Vaso de pp. 1 L. *Pyrex* • Pipeta 10 ml. *Pyrex* • Rollos fotográficos de 35 mm para diapositivas *Fujifilm.* Asa 100/400.
Reactivos/ Sustancias	• Glicerina ($C_3H_8O_3$). G1900. Pureza 99%. *Desarrollo de Especialidades Químicas.* Mty. N.L., Mex. • Fluoresceína sódica en polvo. ($C_{20}H_{10}Na_2OH$). No. Lote: 45350. *Merck*, Alemania.

3.2 Diseño del Bioreactor de 1 L.

El bioreactor de 1 L. utilizado en esta investigación se muestra en la Fig. 4; su diseño se fundamenta en los estudios realizados por Álvarez *et al*, (2002). Se tomaron en cuenta los resultados de los experimentos de visualización de mezclado a excentricidades de 0.21, 0.42 y 0.63 en un tanque cilíndrico sin deflectores y en base a estos se eligieron los valores de E = 0.21 y 0.42, por considerarse conducentes a buenas condiciones de mezclado.

El volumen de la jarra fue seleccionado en base a consideraciones de funcionalidad y representatividad. Se postula que un volumen de 1 L es el mínimo que garantiza experimentos representativos de volúmenes mayores (Lettenbauer, C, *in press;* Catálogo de NBS) y que resulta aun funcional en términos de volúmenes de reactivos.

El bioreactor tiene la característica particular que puede ser adaptado al sistema electrónico de un BIOFLO III de New Brunswick (Fig. 8). De ahí que el diseño de su tapa sea el mostrado en las Figuras 4 y 6. La base que va conectada al rotor es larga porque también se adaptan los electrodos del equipo (Fig. 5) anteriormente mencionado.

La tapa (Fig. 6) tiene la funcionalidad de poder trabajar en cualquiera de las 3 posiciones excéntricas del eje a probar, es decir a E = 0.00, 0.21, 0.42. Esto es posible con solo mover la base del rotor y ajustarla por medio de una tuerca.

La varilla de agitación (Fig. 7) consta de 15 cm de largo por 1 cm de diámetro. Se utilizó una propela de tipo Disco (Fig. 7 y 3) plano de 3 o 5 cm de diámetro.

Fig. 4. Prototipo de Bioreactor Celular de 1 L.

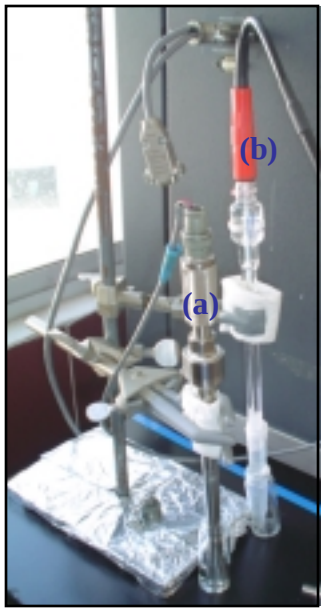


Fig. 5. Electrodos del Bioflo III, New Brunswick Scientific. (a) D.O. (b) p.H., adaptables al reactor prototipo

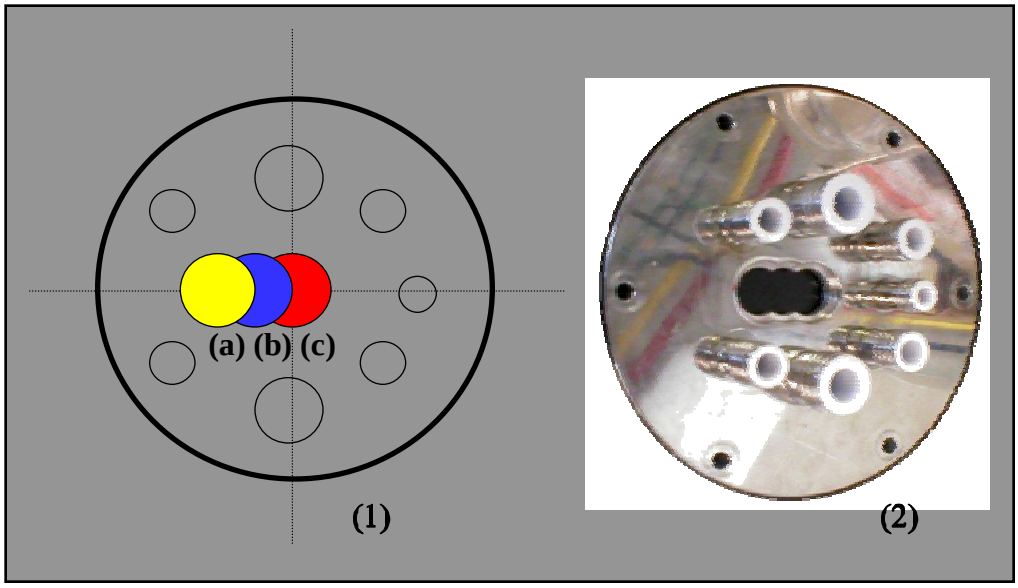


Fig. 6. Tapa del bioreactor prototipo. (1) Excentricidades (E);
(a) E = 0.42 a 2.25 cm del centro; (b) E = 0.21 a 1.25 cm del centro.
(c) E = 0, Concéntrico. (2) Fotografía de la tapa del bioreactor.

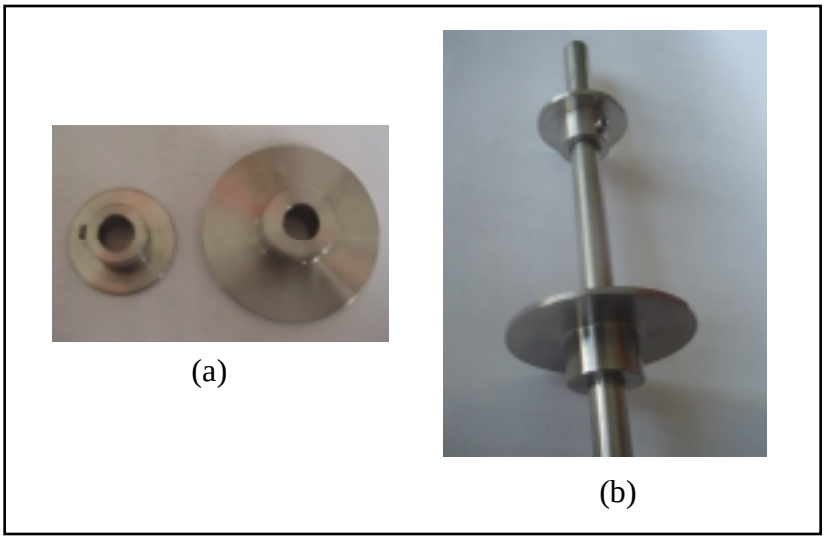


Fig. 7. Equipo de agitación. (a) Propelas de (1) ∅ = 3 cm y (2) ∅ = 5 cm. (b) Eje o varilla de agitación con los discos de agitación.

Fig. 8. Fermentador de New Brunswick Scientific®, Edison, NJ, USA.

3.3 Caracterización del Bioreactor Celular.

3.3.1 Preparación de soluciones Glicerina – Fluoresceína – Agua

En los artículos previos relacionados con el análisis de los patrones de mezclado utilizando trazadores fluorescentes (Álvarez *et al, 2002;* Álvarez et al, 2004; Álvarez *et al*, 2002) no se menciona ninguna estandarización con respecto a la preparación de la sustancia fluorescente. En este estudio, se realizaron diversas pruebas con diferentes proporciones de glicerina-fluoresceína-agua (GFA); y se condujeron pruebas en el Bioreactor con cada una de las 3 combinaciones analizadas.

Tabla 6. Pruebas para elaboración del trazador fluorescente.

	Fluoresceína (g)	Glicerina (ml)	Agua Bidestilada (ml)
Prueba 1	2	40	10
Prueba 2*	1	45	5
Prueba 3	0.5	47	3

* Prueba con mejores resultados

Una vez estandarizada la relación de Glicerina-Fluoresceina-Agua (GFA) a utilizar, se procedió a hacer pruebas para conocer que cantidad de GFA se agregaría en las pruebas en el bioreactor.

Tabla 7. Pruebas de Inyección de GFA.

	Glicerina Pura (ml)	GFA (ml)
Prueba A	1000	5
Prueba B*	1000	3
Prueba C	1000	1

* Prueba con mejores resultados

3.3.2 Visualización de Patrones de Mezclado

Para la visualización de los patrones de mezclado se inyectaron 3 ml del trazador GFA. El bioreactor se ensayó en las 3 excentricidades anteriormente mencionadas (E = 0.00, 0.21, 0.42), realizándose pruebas a 3 velocidades de agitación, 150, 300 y 500 rpm.

Para analizar los patrones de mezclado de cada una de las pruebas se tomaron fotografías de los patrones de mezclado con una cámara Pentax K1000® por periodos de una hora, después de la inyección los disparos fotográficos se hicieron por los dos primeros minutos cada 15 seg. Al concluir los dos minutos y hasta los 5 minutos se tomo una foto cada minuto; posteriormente de los 5 a los 10 una cada 2.5 minutos y después una cada 10 min. hasta llegar a la media hora para concluir con una última foto a los 60 minutos (1 hora). De este modo se documenta el comportamiento dinámico del bioreactor por un tiempo determinado.

El estudio de los patrones de mezclado se realizan en glicerina por ser un líquido de alta viscosidad ($\mu = 1000\mu_{agua}$), que permite observar claramente el camino que sigue el trazador fluorescente dentro del bioreactor, a diferencia del agua, que por su baja viscosidad no permitiría observar los patrones de mezclado tan eficientemente, aunque se sabe de antemano que al colocar las células dentro del bioreactor se tendrá una viscosidad diferente (similar a la del agua) se cree que no cambiaría el patrón de mezclado debido a que en cuanto a densidad se refiere la glicerina y el agua no varían mucho (ρ_{agua}=997.538kg/m^3; $\rho_{glicerina}$=1262.24 kg/m^3).

Tabla 8. Parámetros Establecidos para el análisis de mezclado

Parámetros	**Condiciones**
Velocidades	150, 300, 500 rpm
Altura de propela	10 cm
Posiciones de varilla de agitación	0.00, 0.21, 0.42
Diámetro de disco (propela)	3, 5 cm
Volumen de jarra	1000 $ml_{glicerina}$
Tiempo de mezclado	1 hr

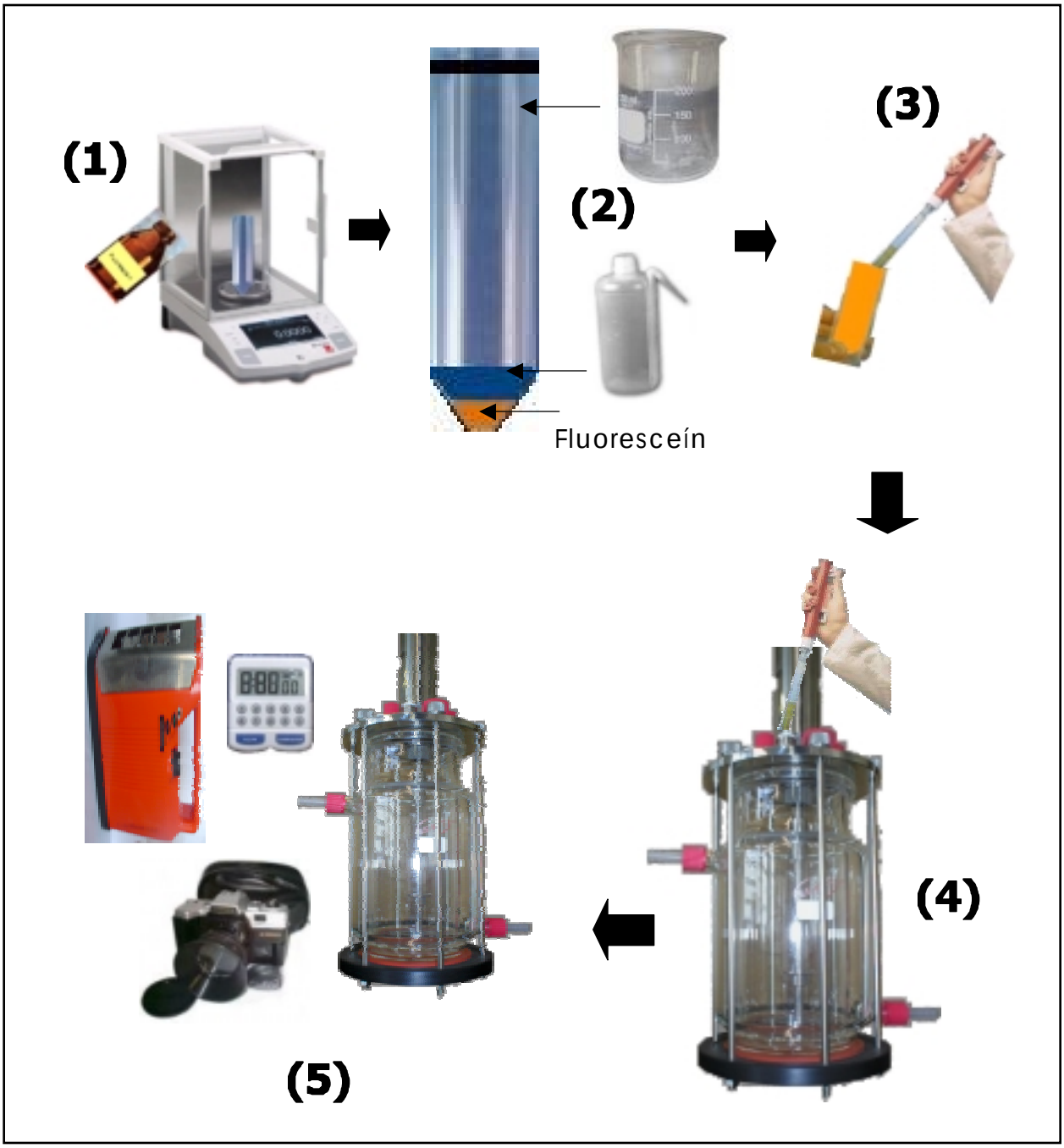


Fig. 9. Diagrama de Proceso. (1) Pesado de la fluoresceína. (2) Preparación de GFA. (3) Pipeteo de 3 ml de GFA. (4) Inyección del GFA al bioreactor. (5) Operación del bioreactor celular y toma de fotografía usando luz UV.

CAPÍTULO IV.
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Optimización de la fórmula de la mezcla Glicerina-Fluoresceina-Agua (GFA)

Al realizar este trabajo se observó la necesidad de estandarizar la composición del trazador así mismo el volumen de aplicación en cada ensayo, debido a que estos parámetros afectan la visualización de los patrones. Una baja o alta concentración no permite observar de forma adecuada el comportamiento, en el primer caso no se aprecian las líneas de mezclado y en el segundo no se obtiene una completa disolución de la fluoresceína en la glicerina.

El ensayo de distintas proporciones de glicerina:fluoresceína:agua mostró que la selección de una mezcla para inyección consistente en $47ml_{glicerina}:1g_{fluoresceína}:3ml_{agua}$. En los experimentos documentados se utilizó una proporción de 3 ml de esta solución GFA por litro de glicerina.

Estas condiciones experimentales permitieron observar claramente los patrones de mezclado en los intervalos de tiempo de 0 a 60 minutos y representa un aporte a los estudios realizados por Álvarez en los cuales la falta de estandarización del trazador puede afectar los resultados observados.

4.2 Caracterización del Bioreactor Celular

Una vez que se obtuvieron las relaciones adecuadas para la mezcla de GFA y se definió la cantidad a inyectar en cada experimento, se ejecutaron los experimentos referidos en la sección 3.3.2.

En general, en los experimentos de visualización aquí referidos, se observan patrones característicos de sistemas de mezclado laminares.

La figura 10 evidencia la presencia de regiones de lento mezclado, por arriba y por debajo del impulsor (marcado con flechas amarillas y círculos rojos).

En sistemas excéntricos, las regiones de lento mezclado no son simétricas, mientras que si lo son en sistemas concéntricos (ver también Alvarez *et al*, 2002)

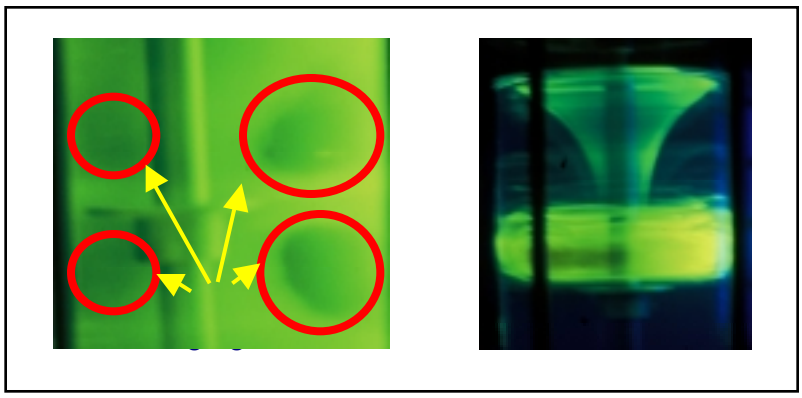


Fig. 10. Patrones de mezclado

4.2.1 Sistemas Concéntricos (Caso base)

El comportamiento de mezclado en tanques concéntricos ha sido extensamente estudiado en literatura (Arratia *et al*, 2003; Álvarez *et al*, 2004; Rivera *et al*, 2004; Álvarez *et al*, 2002; Zalc *et al*, 2002; Lamberto *et al*, 2001; Álvarez *et al*, 2002). El diseño concéntrico es el más frecuentemente utilizado en la mayoría de los sistemas industriales, empleándose ampliamente en industria química "tradicional" y de "especialidad". En particular, es el que se ocupa para la producción de fármacos y también es el sistema que se utiliza en la mayoría de los sistemas de crecimiento celular.

En sistemas concéntricos operados en régimen laminar, se presenta una patología de mezclado recurrentemente: la presencia de una separatriz a la altura del disco (Álvarez *et al.*, 2002). En el caso de la configuración con disco de 3 cm, esta separatriz es muy notoria y robusta (fig. 11), prevalece en el tiempo hasta por espacio de una hora en el rango de agitación de 150 – 500 rpm. Estas separatrices se visualizan en sistemas con diferentes impulsores, tal como lo demuestra Arratia (2002), Lamberto *et al*, (1999) y más recientemente Álvarez *et al* (2004).

Una variante importante del tanque prototipo aquí utilizado con respecto a tanques utilizados en similares estudios (Arratia *et al*, 2002; Álvarez *et al*, 2002), es el sistema de anclaje de la varilla de agitación; debido a que en los estudios anteriores esta se encontraba fija en la base inferior de la jarra de acrílico, lo cuál implica una situación más estable en el flujo generado. En este reporte, debido a que la varilla de agitación se encuentra sujeta únicamente al rotor, situación común en tanques de nivel laboratorio e industriales, se observa mayor oscilación en la propela. Esto a su vez genera inestabilidad del flujo y esperaríamos con ello mejor mezclado con el

disco de ∅ = 5cm (Fig. 13). De hecho, a velocidades superiores, si se logra romper el aro de color (Fig. 14) observado en los estudios anteriormente mencionados.

En la figura 11, se logra observar que la barrera al transporte del trazador de color se logra romper a 300 y 500 rpm. Aún en estas condiciones, al término de una hora todavía se observan zonas segregadas. Estas regiones segregadas de geometría toroidal son muy robustas en el sistema concéntrico con discos de ∅ = 5 cm. En el rango de velocidad de agitación explorado, estas nunca llegaron a desaparecer, aunque la velocidad máxima en la que se trabajó es de 500 rpm y el tiempo máximo de evaluación fue de 2 horas. Esta observación es de vital importancia, ya que si el objetivo es un mezclado eficiente a bajas velocidades para cultivar células en el bioreactor, estos sistemas de mezclado serían ineficientes, ya que no generan caos generalizado y por tanto no garantizan una distribución adecuada de nutrientes y células.

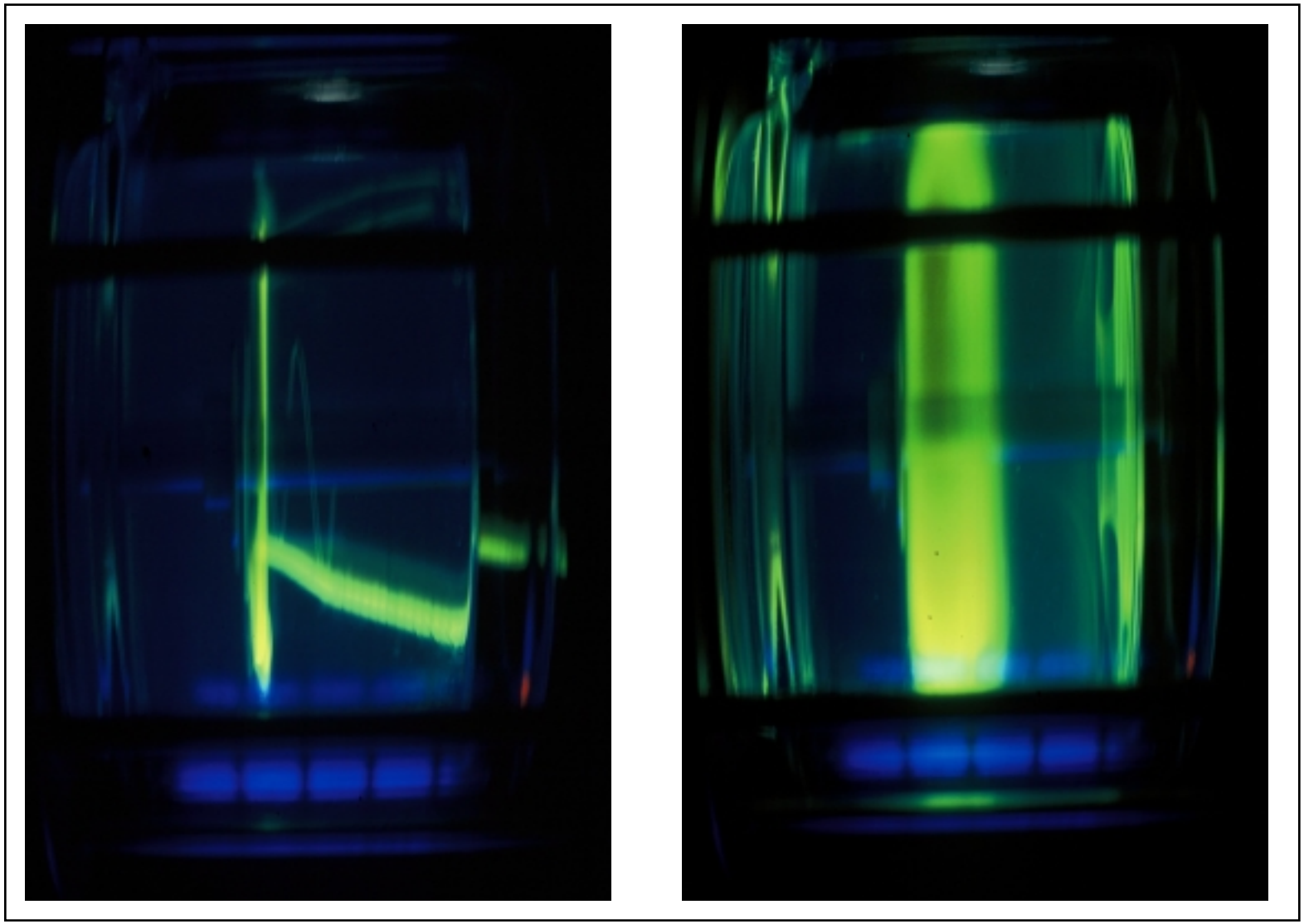


Fig. 11. Separatrices en tanques concéntricos. (a) Inyección de fluoresceína en un sistema con disco ∅ = 3 cm mostrando separatriz marcada desde el momento de la inyección. (b) Persistencia de la separatriz después de 30 min de agitación a 300 rpm

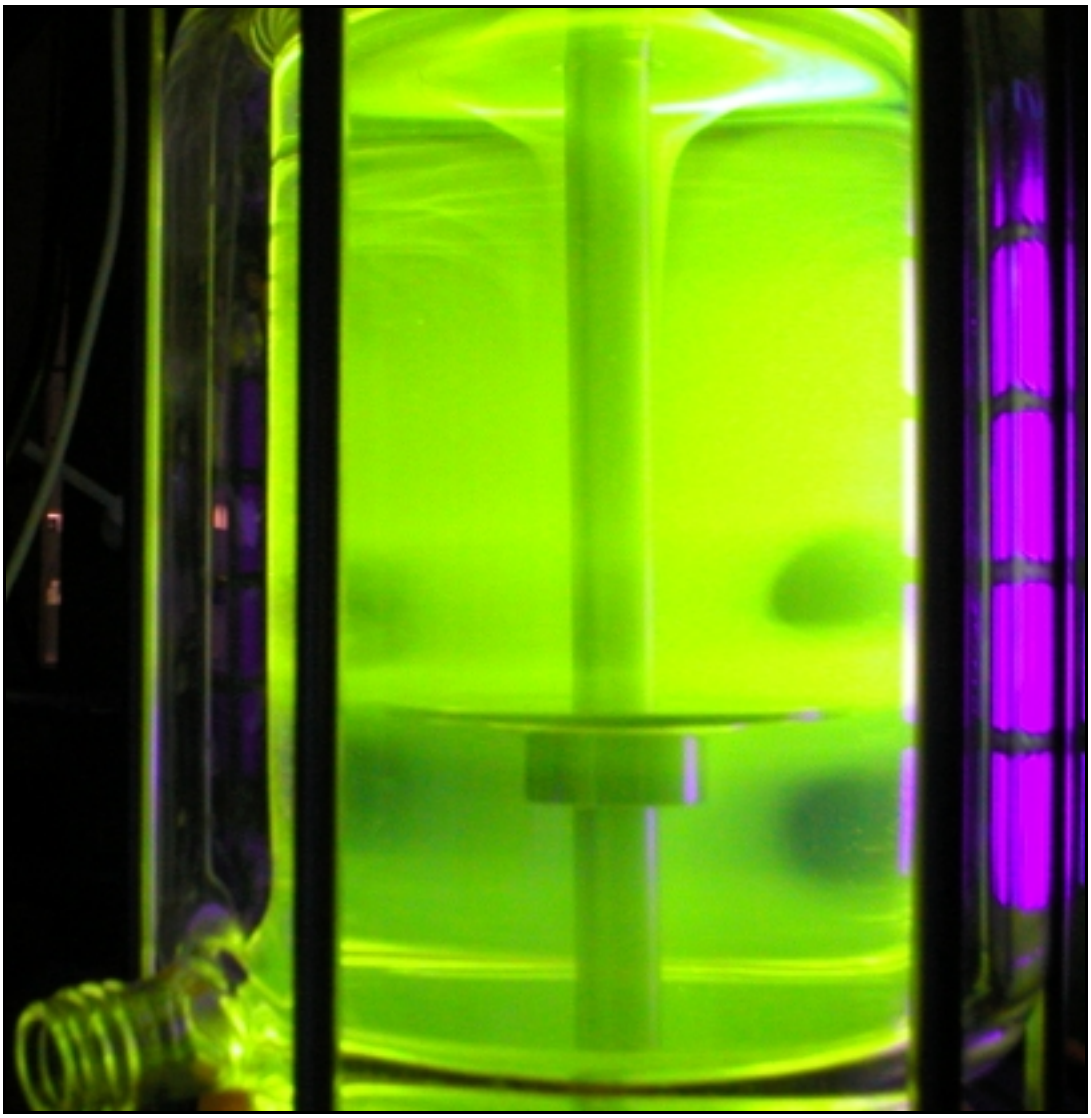
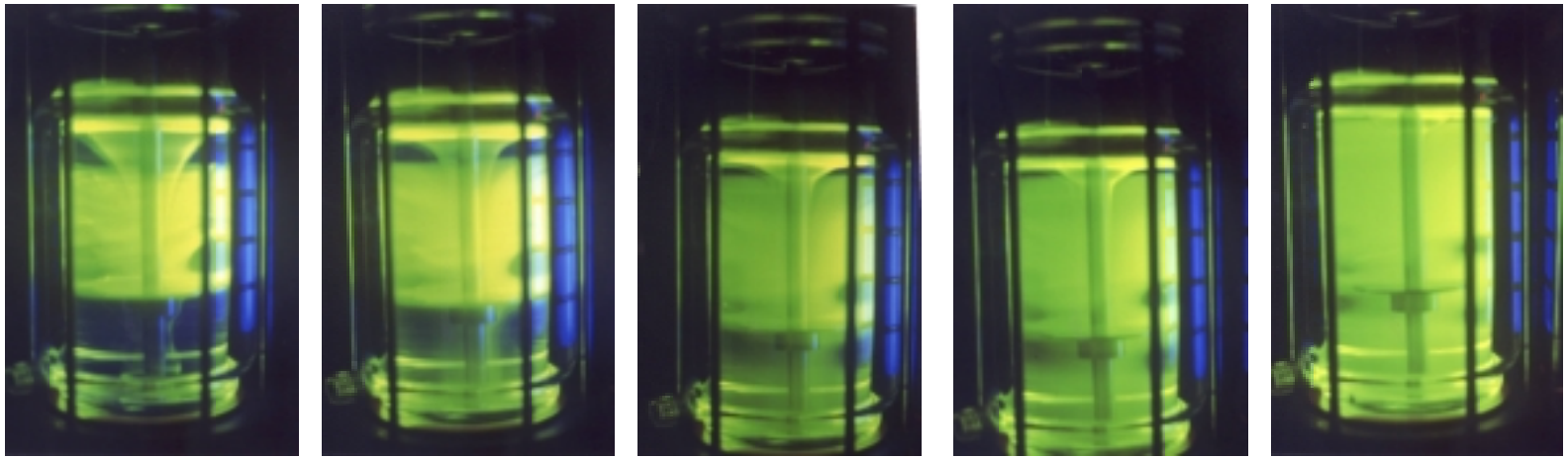
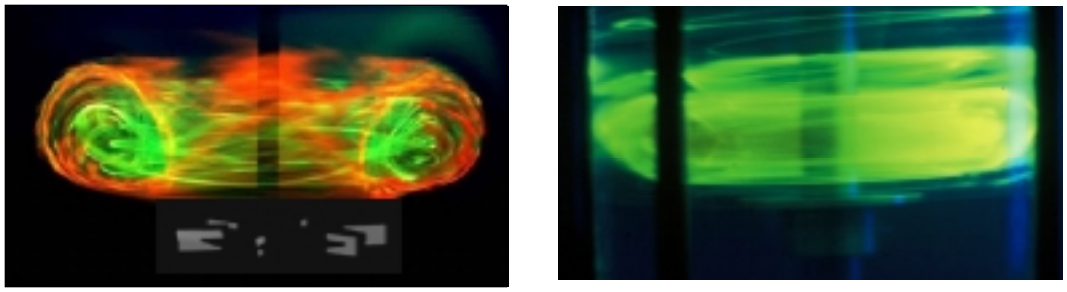


Fig. 12. Zonas segregadas en sistemas concéntricos al término de una hora con disco ∅ = 5cm.



(a) (b) (c) (d) (e)

Fig. 13. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor concéntrico a 300 rpm y disco de 5 cm. (a) 1.15 min; (b) 3 min; (c) 10 min; (d) 20 min; (e) 60 min



(a) (b)

Fig. 14. Aro de trazador fluorescente que no logra mezclarse. (a) Zona de mezclado en donde las 2 sustancias fluorescentes no logran mezclarse. *Arratia et al. 2002.* (b) Sistema concéntrico a 500 rpm.

En la tabla 9, se presentan los tiempos de mezclado estimados en base a experimentos con trazadores fluorescentes. Se puede comprobar (ver también figs. 13 y 14), que con un disco ∅ = 5 cm se obtiene un mezclado más eficiente antes de una hora con respecto al alcanzado con el disco ∅ = 3 cm. En este último caso, no importa a que velocidad se agite, el tiempo de mezclado no es menor a una hora. Como se menciono anteriormente, la presencia de cuerpos toroidales regulares y escasa presencia del trazador fluorescente en la parte superior del tanque, son características distintivas del modelo concéntrico. En la tabla 8, se muestra una columna en donde se reporta la estimación visual del tiempo inicial de mezclado, el cuál representa la ruptura de la separatriz referida en los párrafos anteriores.

Tabla 9. Resultados experimentales obtenidos con el reactor en su configuración concéntrica

No	$\varnothing_{disco}$ (cm)	Re	h_{disco} (cm)	v (rpm)	E	$t_{m.i.}$ (min)	$t_{m.t.}$ (min)
1*	3	4.5	5	150	0.0	> 60	>>> 60
2*	3	4.5	5	150	0.0	> 60	>>> 60
3*	3	4.5	5	150	0.0	> 60	>>> 60
4*	3	9	5	300	0.0	> 60	>>> 60
5*	3	9	5	300	0.0	> 60	>>> 60
6*	3	9	5	300	0.0	> 60	>>> 60
7*	3	15	5	500	0.0	> 60	>>> 60
8*	3	15	5	500	0.0	> 60	>>> 60
9*	3	15	5	500	0.0	> 60	>>> 60
10	5	25	5	300	0.0	6	60
11	5	25	5	300	0.0	8	60
12	5	25	5	300	0.0	7	58
13	5	41	5	500	0.0	5	45
14	5	41	5	500	0.0	4	45
15	5	41	5	500	0.0	5	45

* Sistemas en los cuales el trazador no pasa a la parte inferior en tiempos menores a 60 min
$t_{m.i.}$: tiempo de mezclado inicial · $t_{m.t.}$: tiempo de mezclado total · $\varnothing_{disco:}$ Diámetro de disco
Re: Número de Reynolds · h_{disco}: Altura del disco · E: Excentricidad

4.2.2 Sistemas Excéntricos (E = 0.21)

En esta sección se reportan los resultados para un sistema excéntrico E = 0.21, el cual presenta características similares a aquellas del caso concéntrico (prevalencia de regiones segregadas y separatrices). Sin embargo, ya se observan desviaciones en cuanto a los patrones de flujo observados, particularmente para el caso de altas velocidades.

Los patrones de flujo de los sistemas excéntricos sistemas ya no son simétricos (fig. 15), como el caso base. Este comportamiento lo reporta en sus

experimentos Álvarez *et al*, (2002) y en sus resultados computacionales Rivera *et al*, (2004).

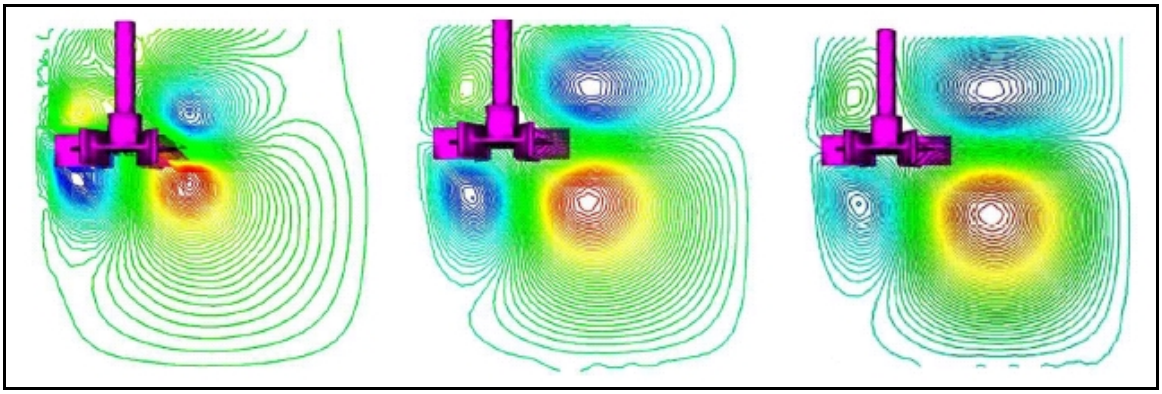


Fig. 15. Zonas segregadas en un reactor excéntrico a diferentes tiempos según Rivera et al, 2004.

El estudio de Rivera et al (2004) se basa en un análisis computacional, de un sistema excéntrico de tanque agitado, en el cuál el impulsor es una turbina "Rushton", posicionada a (1/4)D en dirección radial y (2/3)H en dirección axial. Para el análisis se uso un fluido Newtoniano de viscosidad de 0.5 Pa s y una densidad de 1000 kg/m^3, y el régimen a trabajar fue de un Re = 14. Como se puede observar en la figura 15, los resultados fueron secciones segregadas asimétricas posicionadas en la parte superior e inferior al impeler; siendo notorias las diferencias de tamaño en cada una de las secciones segregadas. Ascanio *et* al, (2002), aunque no mencionan estimados de tiempos totales de mezclado, si refiere que estos disminuyen drásticamente usando un impulsor desplazado en dirección axial y radial. En la tabla 10 se reportan estimaciones de tiempo de mezclado para la configuración excéntrica E=0.21.

En esta investigación se observa que con el disco de ∅ = 5 cm, se tiene un mejor mezclado que con el de ∅ = 3 cm. Esto se atribuye a que el área que cubre este diámetro de disco es mayor. En este sistema también se forman zonas segregadas (fig. 16) pero menores que en el caso concéntrico, tal cuál se ha descrito por Ascanio *et al*,

2002. Estas zonas pierden su simetría con respecto al caso concéntrico y son menores en el lado más cercano a la pared de la jarra, llegando a casi desvanecerse a altos valores de velocidades (500 rpm). Las zonas segregadas son alargadas, no circulares como en el concéntrico. Las que están del otro lado de la varilla de agitación son un poco más grandes que en el caso base, esto aunado a que están más alejadas del eje.

En comparación con las imágenes computacionales reportadas por Rivera *et al*, 2002, no se encuentran diferencias geométricas notorias. Tanto en este trabajo como en el de Rivera y colaboradores, se utilizan impulsores radiales, con la salvedad que ellos utilizaban un sistema con impulsor "Rushton" y en esta investigación se utiliza un impulsor de "disco".

En el caso de E-0.21 los tiempos de mezclado (tabla 10) son sustancialmente menores en el caso del disco ∅ = 5 cm que en el de ∅ = 3 cm. En las Fig. 17 y 18, el lector podrá observar la evolución de patrones de mezclado en sistemas E=0.21 con discos de 3 y 5 cm. de diámetro. En ambos casos, la evolución de patrones en estadíos tempranos (los primeros 10 minutos del proceso), es más rápida que en el caso concéntrico. Obsérvese en la Figura 18, la asimetría de los patrones observables en la parte superior del tanque.

Como se puede observar en las Figuras 17 y 18, en esta excentricidad se observa una separatriz, no tan marcada y robusta como en el caso concéntrico, pero aún presente. El transporte desde la parte superior del tanque también se ve mejorado sustancialmente por el ligero desplazamiento del eje de agitación. Aproximadamente a los 30 segundos de agitación, la sustancia fluorescente comienza a visitar la celda inferior del tanque, que en el caso concéntrico solo invadía en tiempos más largos.

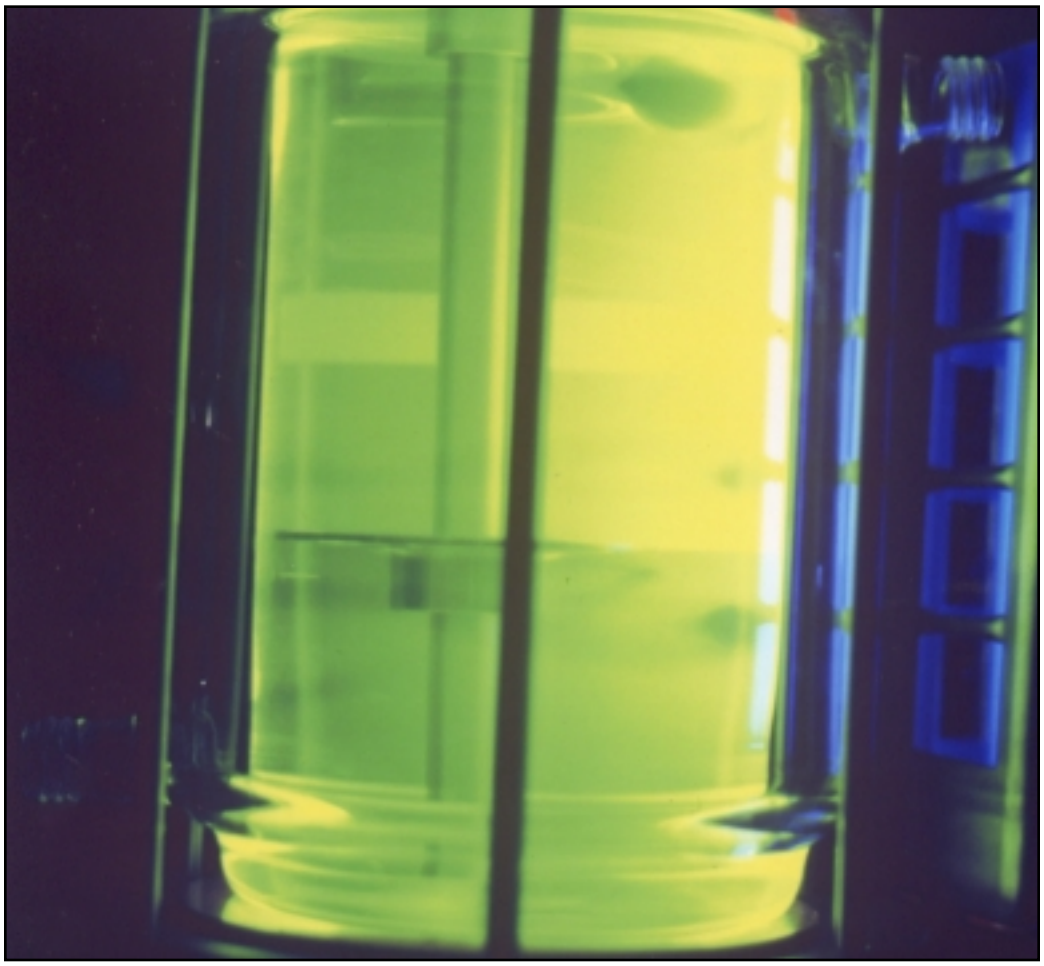
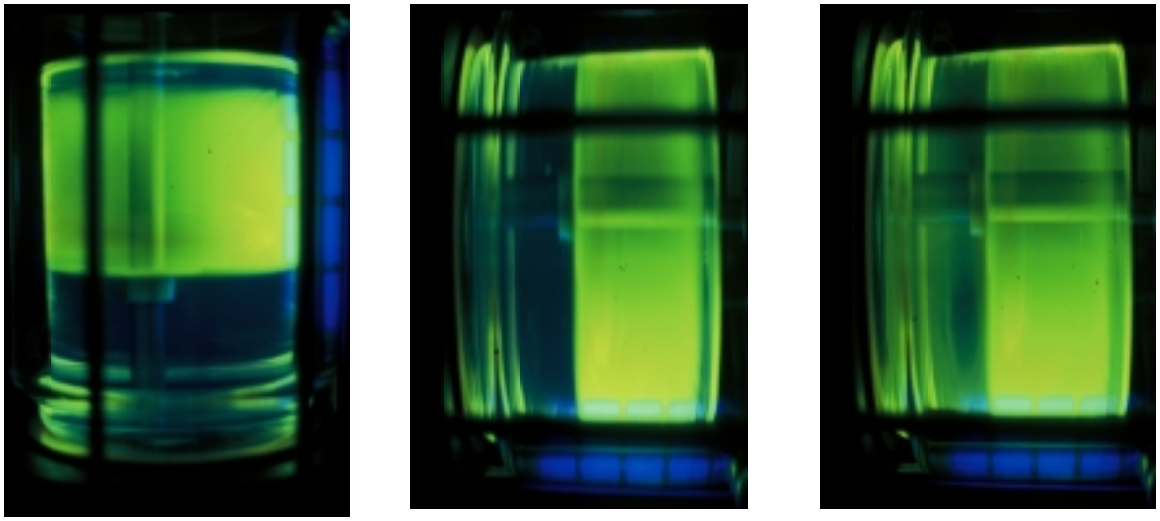
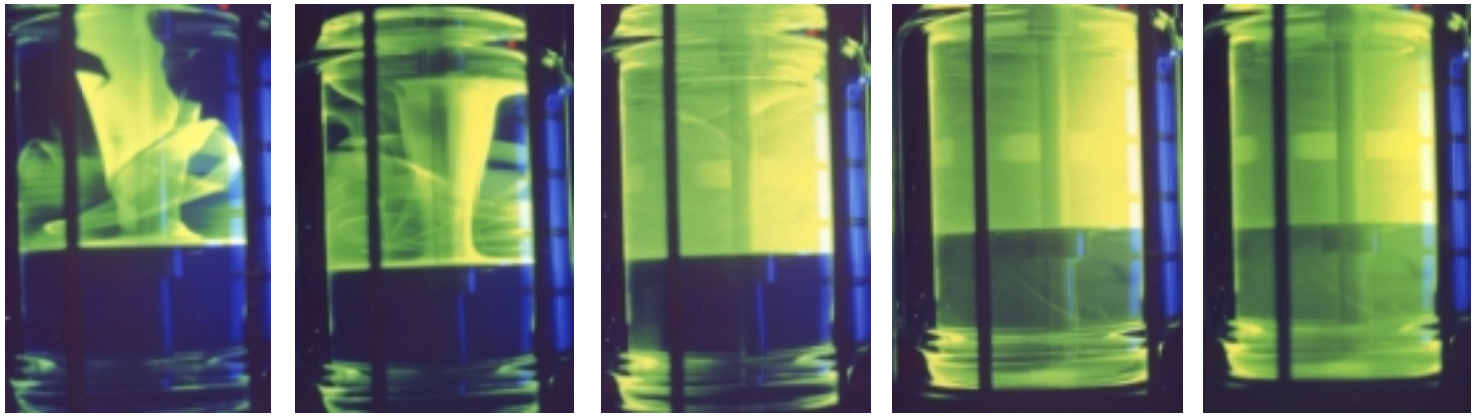


Fig. 16. Zonas segregadas en sistemas E = 0.21, $\varnothing_{disco}$ = 5 cm. t = 60 min.



(a) (b) (c)

Fig. 17. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor con excentricidad de 0.21 a 500 rpm y disco de 3 cm. (a) 20 min; (b) 30 min; (c) 60 min.



(a) (b) (c) (d) (e)

Fig. 18. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor con excentricidad de 0.21 a 300 rpm y disco de 5 cm. (a) 45 seg; (b) 1 min; (c) 1.75 min; (d) 5 min; (e) 30 min.

Tabla 10. Experimentos con el bioreactor a una excentricidad de 0.21

No	$\varnothing_{disco}$ (cm)	Re	h_{disco} (cm)	v (rpm)	E	$t_{m.i.}$ (min)	$t_{m.t.}$ (min)
1	3	4.5	5	150	0.21	> 60	>>> 60
2	3	4.5	5	150	0.21	> 60	>>> 60
3	3	4.5	5	150	0.21	> 60	>>> 60
4	3	9	5	300	0.21	15	> 60
5	3	9	5	300	0.21	17	> 60
6	3	9	5	300	0.21	20	> 60
7	3	15	5	500	0.21	8	60
8	3	15	5	500	0.21	10	55
9	3	15	5	500	0.21	7	60
10	5	25	5	300	0.21	5	30
11	5	25	5	300	0.21	5	32
12	5	25	5	300	0.21	5	31
13	5	41	5	500	0.21	4	10
14	5	41	5	500	0.21	3	11
15	5	41	5	500	0.21	4	11

$t_{m.i}$: tiempo de mezclado inicial · $t_{m.t}$: tiempo de mezclado total · $\varnothing_{disco:}$ Diámetro de disco
Re: Número de Reynolds · h_{disco}: Altura del disco · E: Excentricidad

4.2.3 Sistemas Excéntricos II. (E = 0.42)

En los sistemas con E = 0.42, se observa caos más generalizado, debido a que se alejan más de la configuración concéntrica, y con esto pierden su simetría. En términos generales, y a diferencia de lo observado para sistemas concéntricos y excéntricos E = 0.21 donde un mayor diámetro de disco implica menor tiempo de mezclado, en los sistemas excéntricos E = 0.42, el impulsor ∅ = 3 cm resulta ser más eficiente. En el disco de mayor diámetro el espacio entre la pared de la jarra, uno de sus lados es mínimo, originando una separatriz más robusta. Esto hace más ineficiente el mezclado. Este fenómeno se enfatiza aun más a alta velocidad de agitación (fig. 19). En el disco de ∅ = 3 cm se obtiene el mejor sistema de mezclado de todos los casos (fig. 21). En la tabla 11 se constata que a altas velocidades es

donde se presentan más cortos tiempos de mezclado y un estado final más homogéneo. Las zonas segregadas toroidales desaparecen casi por completo a una velocidad de 500 rpm (fig. 21).

En comparación con el caso concéntrico en sistemas con disco ∅ = 3 cm y E = 0.42, al paso de 15 segundos parte de la sustancia fluorescente ha invadido la parte superior del tanque. En el caso concéntrico esto sólo ocurre al mínimo (fig. 22).

Álvarez *et al*, 2002, documenta que a altos valores de excentricidad (0.42 y 0.63) las zonas segregadas son esencialmente eliminadas. A E = 0.42 la invasión de fluido fluorescente avanza más rápidamente que en los dos casos anteriores (E = 0.00, 0.21), la separatriz media es eliminada eficientemente y prácticamente se cubre toda el área del vaso antes de 1 hr. Aunque como ya se ha mencionado en ocasiones anteriores, el sistema de impulsores es totalmente diferente al que se propone en esta investigación, los patrones de flujo son muy similares.

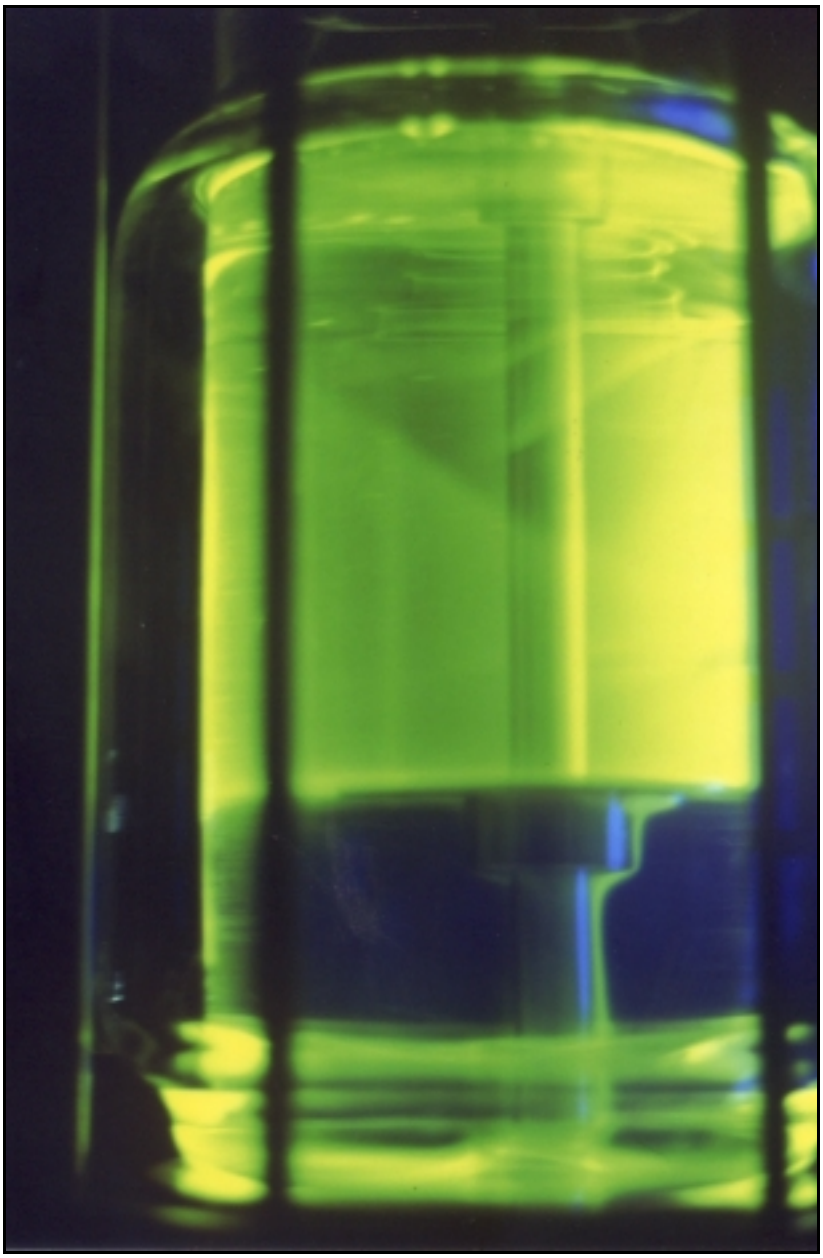
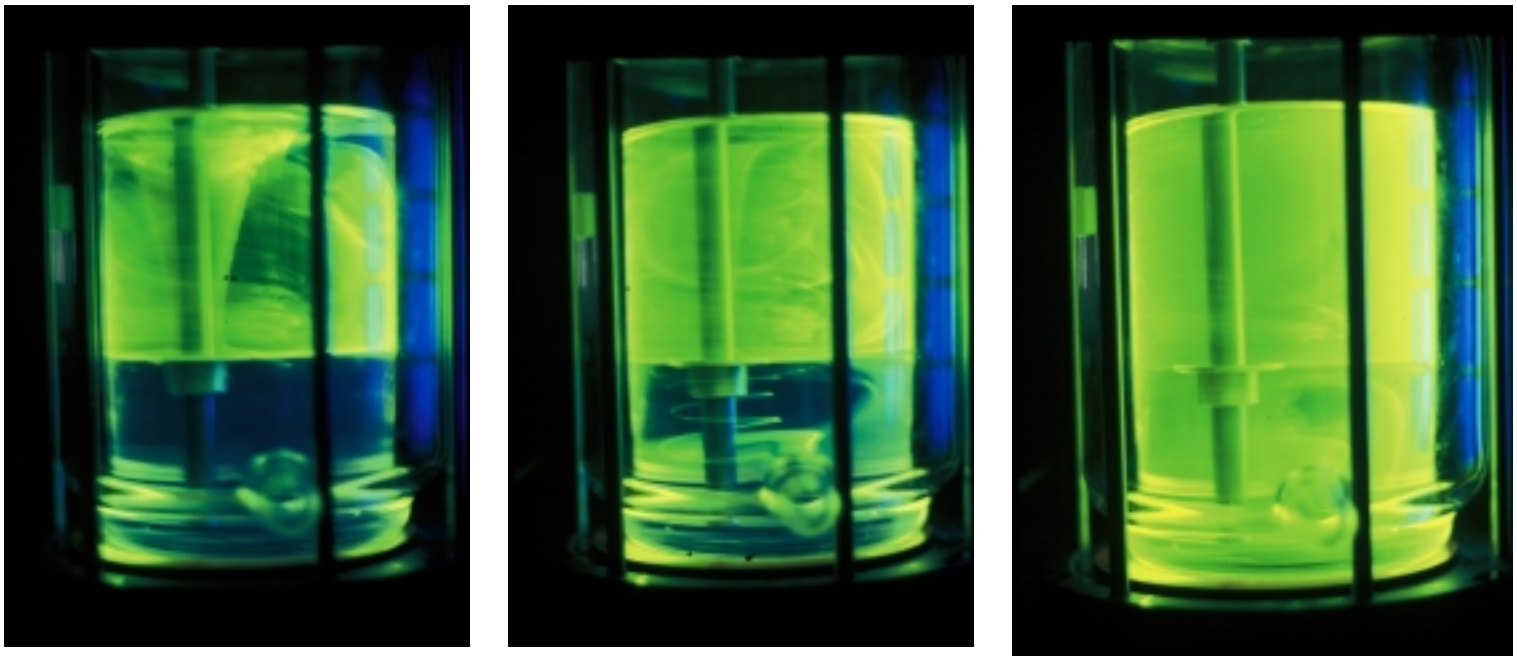


Fig. 19. Barrera existente en sistemas E = 0.42, $\varnothing_{disco}$ = 5cm, v = 500 rpm.



(a) (b) (c)

Fig. 20. Patrones de mezclado a diferentes tiempos en un bioreactor con excentricidad de 0.42 a 500 rpm y disco de 5 cm. (a) 45 seg; (b) 1 min 45 seg; (c) 5 min.

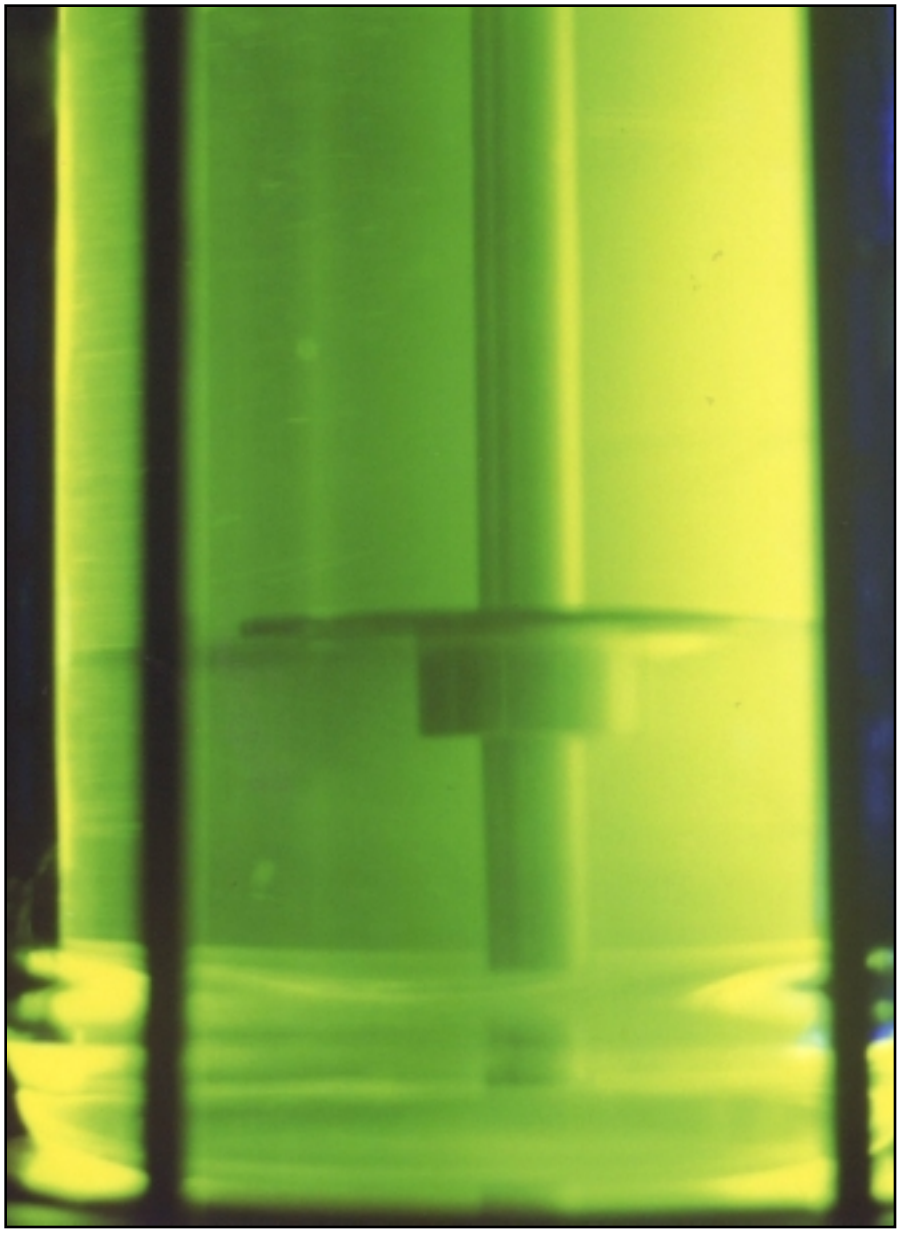
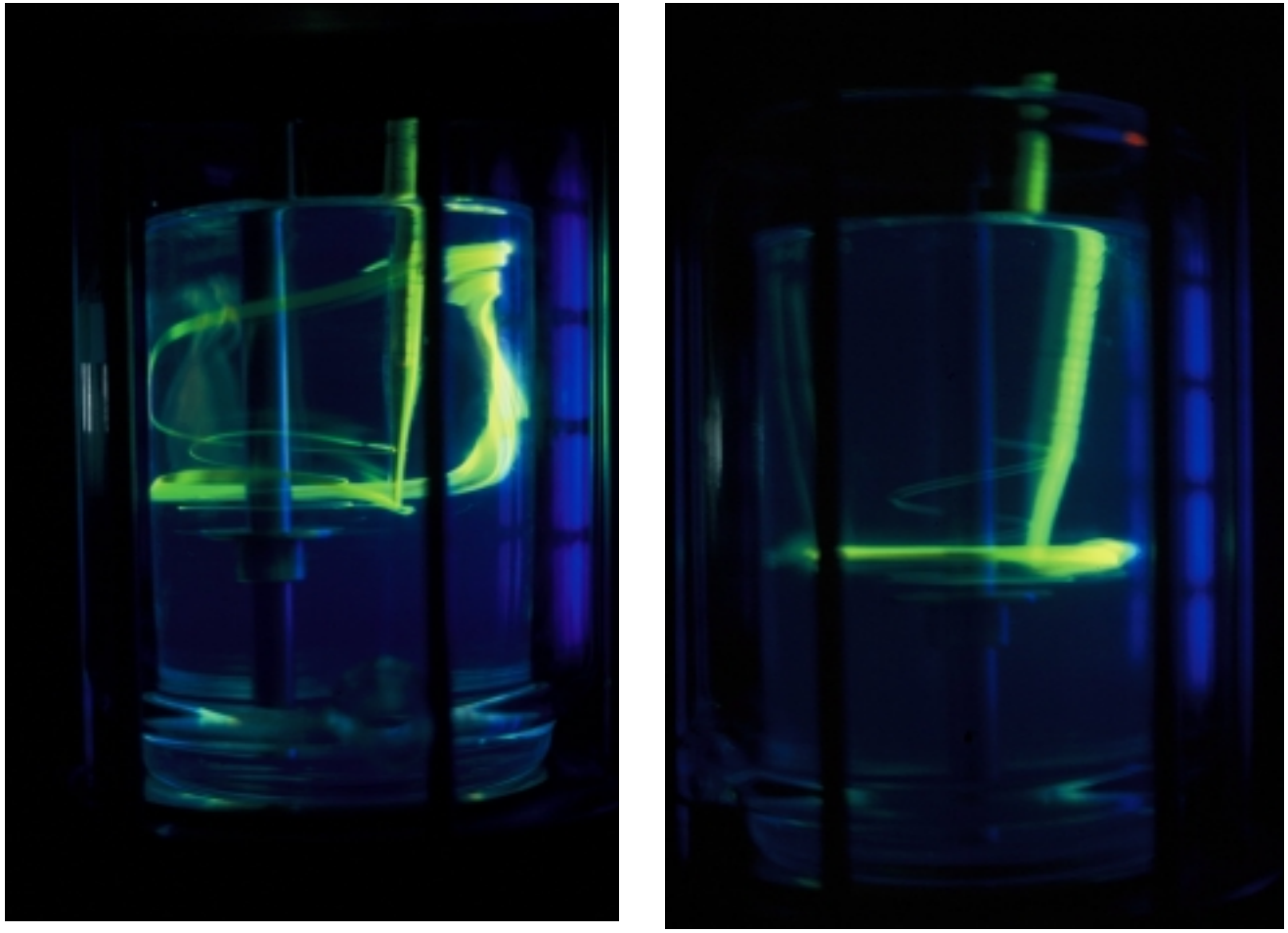


Fig. 21. Destrucción de zonas segregadas en sistemas excéntricos
(t = 8 min,, v = 300 rpm, $\varnothing_{disco}$ =3 cm)



(a) (b)

Fig. 22. Comparación del comportamiento a los 15 seg. en un (a) sistema excéntrico E = 0.42 vs un (b) sistema concéntrico

Tabla 11. Experimentos con el reactor a una excentricidad de 0.42

No	$\varnothing_{disco}$ (cm)	Re	h_{disco} (cm)	*v* (rpm)	E	$t_{m.i.}$ (min)	$t_{m.t.}$ (min)
1	3	4.5	5	150	0.42	30	> 60
2	3	4.5	5	150	0.42	30	> 60
3	3	4.5	5	150	0.42	28	> 60
4	3	9	5	300	0.42	6	15
5	3	9	5	300	0.42	17	30
6	3	9	5	300	0.42	6	15
7	3	15	5	500	0.42	1	6
8	3	15	5	500	0.42	1	5
9	3	15	5	500	0.42	2	7
11	5	25	5	300	0.42	1	7
12	5	25	5	300	0.42	1	7
13	5	25	5	300	0.42	1	8
14	5	41	5	500	0.42	2	30
15	5	41	5	500	0.42	2	30
16	5	41	5	500	0.42	2	26

$t_{m.i}$: Tiempo de mezclado inicial · $t_{m.t}$: Tiempo de mezclado total · $\varnothing_{disco:}$ Diámetro de disco
Re: Número de Reynolds · h_{disco}: Altura del disco · E: Excentricidad

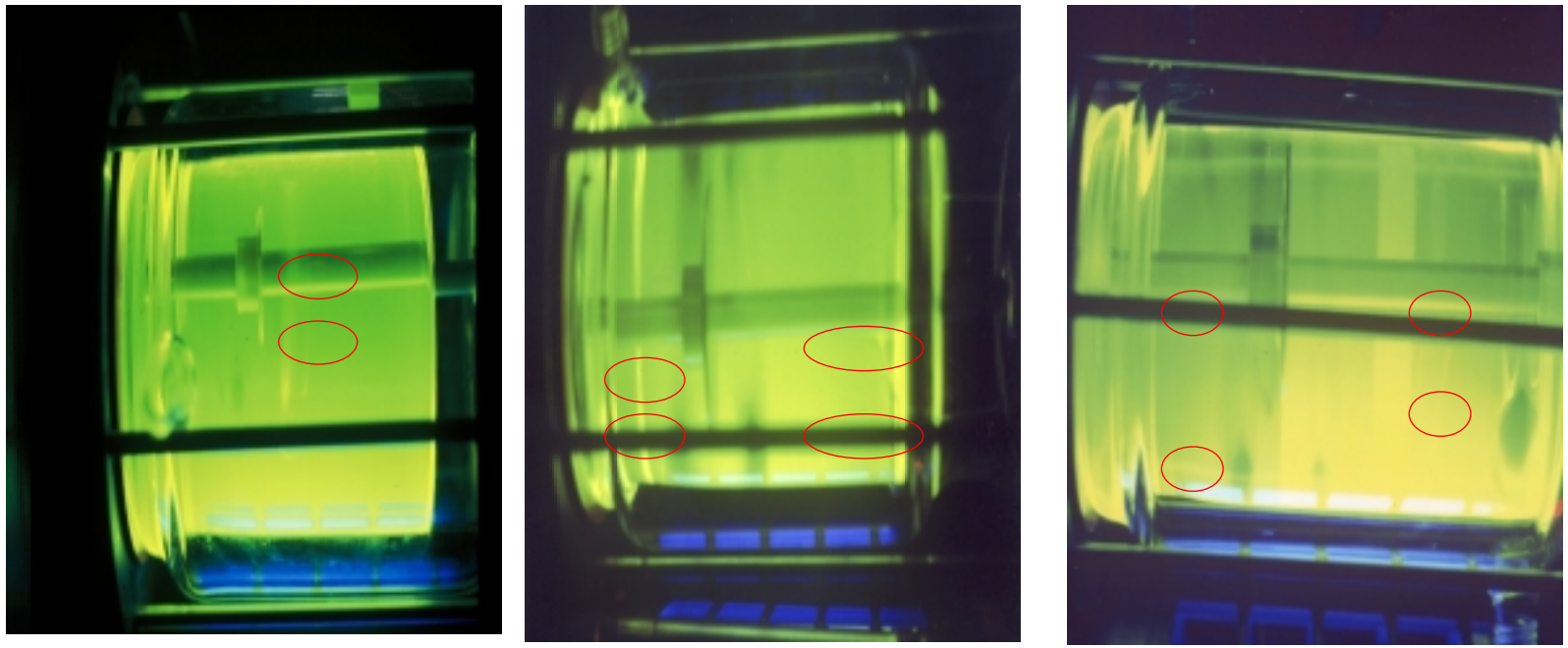
4.2.4. Comparación de sistemas

Las mejores condiciones de mezclado de cada una de las etapas se muestran en la tabla 12 y se visualizan en la Fig. 25. Establecer estas condiciones es relevante, ya que constituyen las bases para diseño geométrico de un sistema eficiente de crecimiento para células sensibles a estrés mecánico. Los niveles de velocidad explorados en esta investigación (ventana de 150-500 rpm), equivaldrían, por el criterio de Re equivalente, a valores de agitación menores a una revolución por minuto para sistemas altamente acuosos. Siendo esta la característica de los medios de cultivo de células de mamífero e insecto, esta investigación evidencia que es posible mezclar eficientemente a velocidades menores a 10 rpm y empleando agitadores sin aspas.

Tabla 12. Comparación de las condiciones óptimas en cada posición de eje

Posición (E)	***v* (r.p.m.)**	**$t_{Mezclado}$ (min)**	**$\varnothing_{Disco}$ (cm)**
0.0	500	120	3
0.0	300	80	5
0.21	500	55	3
0.21	300	10	5
0.42	500	6	3
0.42	300	10	5

E: Excentricidad · *v*: Velocidad · $t_{Mezclado}$: Tiempo de mezclado · $\varnothing_{Disco}$: Diámetro de disco



(a) (b) (c)

Fig. 23. Comparación del mezclado final en diferentes pruebas.
(a) $\varnothing_{disco}$ = 3 cm, E = 0.42, v = 500 rpm. (b) $\varnothing_{disco}$ = 5 cm, E = 0.0, v = 500 rpm.
(c) $\varnothing_{disco}$ = 5 cm, E = 0.21, v = 300 rpm.

CAPÍTULO V.
CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones

Este estudio aporta avances en distintos frentes:

(a) Se diseñó y construyó un sistema de bioreactor prototipo de 1 L para el estudio de patrones de mezclado en sistemas excéntricos. Aunque no es propósito ni alcance de esta investigación trabajar con líneas celulares, dicho sistema fue construido para posibilitar tal vertiente de trabajo futuro (sistema esterilizable, que acepta electrodos para medición de O_2 y pH, acoplable a una consola controladora de parámetros críticos, con sistema de control de temperatura, capaz de mantener ambientes de trabajo estériles, construido en acero inoxidable y vidrio, etc).

(b) Se estandarizó la mezcla de GFA (glicerina-fluorisceina-agua) que se inyecta para el estudio de los patrones de flujo, y así mismo el protocolo de preparación e inyección de esta de acuerdo al volumen del tanque. Por cada 1000 ml de Glicerina pura se inyectan 3 ml de la mezcla de GFA que contiene 45 $ml_{glicerina}$, 1 $g_{fluoresceína}$, 5 $ml_{agua\ bidestilada.}$

(c) Se recomienda E=0.42 como valor de diseño, utilizando mezcladores de bajo estrés mecánico (discos sin aspas). Un sistema excéntrico con estas características tiene un mejor comportamiento que un sistema concéntrico o uno excéntrico E=0.21. El tiempo de mezclado en sistemas excéntricos E=0.42 se ve reducido órdenes de magnitud con respecto a excentricidades menores. A velocidades de 500 RPM, es

posible erradicar, en términos prácticos, las zonas segregadas comunes en sistemas laminares concéntricos.

(d) Se sugiere utilizar una relación d/D=0.33 (diámetro del impulsor/diámetro del tanque). Esta condición es suficiente para asegurar mezclado en regímenes de Re menores de 41. Relaciones superiores son desventajosas, por favorecer la reaparición de separatrices más robustas, particularmente al incrementar velocidad de agitación.

(e) Se recomienda la geometría E=0.42, d/D=0.33, H/D=1.2, C/H=5/12 como caso base para probar el desempeño de sistemas excéntricos en procesos de crecimiento celular.

(f) La visualización de los patrones de mezclado nos permiten ver de forma experimental lo que está sucediendo dentro del bioreactor, sin embargo, sería conveniente complementar este conocimiento mediante la modelación computacional para tener un panorama más amplio de lo que sucede dentro del mismo.

CAPÍTULO VI.
BIBLIOGRAFÍA

6.1 Bibliografía

1. Álvarez, M.M. (2000). Using spatiotemporal asymmetry to enhance mixing in chaotic flows: from maps to stirred tanks. Ph. D. Thesis, Chemical and Biochemical Engineering. Rutgers University, New Brunswick, N.J.

2. Álvarez, M.M., Arratia, P.E., Muzzio, F.J. (2002). Laminar mixing in eccentric stirred tank systems. *Canadian Journal of Chemical Engineering, 80, 546.*

3. Álvarez, M.M., Muzzio, F.J., Cerbelli, S., Adrover, A., Giona, M. (1998). *Physics Review Letters, 81, 3395.*

4. Álvarez, M.M., Zalc, J., Shinbrot, T., Arratia, P.E., Muzzio, F.J. (2002). Mechanism of mixing and creation of structure in laminar stirred tanks. *A.I.Ch.E. Journal 48, 2135.*

5. Álvarez-Hernández, M.M., Shinbrot, T., Zalc, J., Muzzio, F.J. (2002). Practical chaotic mixing. *Chemical Engineering Science, 57, 3749.*

6. Arratia, P.E., Álvarez, M.M., Fernando, J., Muzzio, F.J. (2004). Three-dimensional chaotic mixing. *Physics of fluids. 16, 9.*

7. Arratia, P.E., Lacombe, J.P., Shinbrot, T., Muzzio, F.J. (2003). Segregated regions in continuous laminar stirred tank reactors. *Chemical Engineering Science, 59, 1481.*

8. Bakker, A. Haidariand, A.H., Marshall, E.M.. (2001). Design reactors via CFD. *CEP magazine, 30.*

9. Bakker, A., LaRoche, R.D., Marshall, E.M. (2000). Laminar flow in static mixers with helical elements. *The Online CFM Book. http://www.bakker.org/cfm.*

10. Biggs, R.D. (1963). Mixing rates in stirred tanks. *AIChE, 9, 636.*

11. Curran, S.J., Black, R.A. (2004). Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chemical Engineering Science, 59, 5859.*

12. Chattopadhyay, S., Srivastava, A., Bhojwani, S., Bisaria, V. (2001). Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 93, 2.*

13. Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T. (1998). Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnology Bioengineering, 32, 1001.*

14. Chisti, M.Y. (1989). Airlift Bioreactors. *Elservier Applied Science.*

15. Dickey, D.S., Bittorf, K.J., Ramsey, C.J., Johnson, K.E. (2004). Understand flow patterns in glass-lined reactors. *CEP magazine, 21.*

16. Fountain, G.O., Khakhar, D.V., Ottino, J.M. (1998). Visualition of three-dimensional chaos. *Science 281, 683.*

17. Galindo, E., Larralde-Corona, P., Brito, T., Córdova-Aguilar, M.S., Tabeada, B., Vega-Alvarado, L., Corkidi, G. (2004). Development of advanced image análisis techniques for the in situ characterization of multiphase dispersions occurring in bioreactors. *Journal of Biotechnology, Article in press.*

18. Graham, M.D., Kevrekidis, I.G., Asakura, K., Lauterbach, J., Krischer, K., Rotermund, H., Ertl, G. (1994). *Science, 264, 80k.*

19. Graziosi, P. (1960). *Paleolithic art. (p. 120).* New York: McGraw-Hill.

20. Hayes, R.E., Afacam, A., Boulanger, B., Tanguy, P.A. (1998). Experimental Study of Reactive Mixing in a Laminar Flow Batch Reactor. *Trans. IChemE, 76, 73.*

21. Harvey III., A.D., Wood, S.P., Leng, D.E. Experimental and computational study of multiple impeller flows. *Chemical Engineering Science, 52, 1479.*

22. Joosten, G.E.H., Schilder, J.G.M., Broere, A.M. (1977). The suspension of flotating solids in stirred vessels. *Chem. Eng. Sci. 51, 5.*

23. Kling, K., Mewes, D. (2004) Two-colour laser induced fluorescence for the quantification of micro- and macromixing in stirred vessels. *Chemical Engineering Science, 59, 1523.*

24. Kramers, H., Baars, G.M., Knoll, W.H. (1953). A comparative study on the rate of mixing in stirred tanks. *Chemical Engineering Science, 2, 35.*

25. Lamberto, D.J., Álvarez, M.M., Muzzio, F.J. (1999). Experimental and computacional investigation of the laminar flor structure in a stirred tank. *Chemical Engineering Science, 54, 919.*

26. Lamberto, D.J., Álvarez, M.M., Muzzio, F.J. (1999). Computacional análisis of regular chaotic mixing in a stirred tank reactor. *Chemical Engineering Science, 56, 4887.*

27. Lamberto, D.J., Muzzio, F.J., Swanson, P.D. (1996). Using time-dependent RPM to enhance mixing in stirred vessels. *Chemical Engineering Science, 51, 733.*

28. Lettenbauer, C., Eibl, R., Viviani, A., Singh, V., Röll., M. (*en impresión*) Stability of the wave reactor for cultivation of animal and plant cell cultures. *University of Münster*.

29. Levenspiel, O. (1998). Ingeniería de las Reacciones Químicas. Ed. Reverté. México.

30. Majda, A.J., McLaughlin, R.M. (1993). The effect of mean flows on enhanced diffusivity in transport by incompressible periodic velocity fields. *Studies on Applied Mathematics, 89, 245.*

31. Muzzio, F.J., Álvarez, M.M., Cerbelli, S., Giona, M., Adrover, A. (2000). The intermaterial area density and striation thickness distribution generated by time- and spatially-periodic 2D chaotic flows. *Chemical Engineering Science, 55, 1497.*

32. New Brunswick Scientific. Catalogo de Productos.

33. Nienow, A.W., Elson, T.P. (1998). Aspects of mixing in rheologically complex fluids. *Chem. Eng. Res. & Design, 66, 5.*

34. Norwood, K.W., Metzner, A.B. (1960). Flow patterns and mixing rates in agitated vessels. *AIChe J., 6, 432.*

35. Peña, C., Galindo, E., Díaz, M. (2002). Effectiveness factor in biological external convection: study in high viscosity systems. *Journal of Biotechnology, 95, 1.*

36. Rivera, C., Heniche, M., Ascanio, G., Tanguy, P. (2004). A virtual finite element model for centered and eccentric mixer configurations. *Computers and Chemical Engineering, 28, 2459.*

37. Rodríguez, A.C., Cabrera, A.I., Valencia, J.I. (*in press*). Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un bioreactor prototipo. *Instituto Politécnico Nacional.* México, D.F.

38. Saini, S., Wick, T.M. (2003). Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development. *Biotechnol. Prog., 19, 510.*

39. Santamaría, J.M., Erguido, J., Méndez, M.A., Monzón, A. (1999) Ingeniería de reactores. Ed. Síntesis. Madrid, España.

40. Shane, M.S., Hamel, J., Wang, D.I. (1987). Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotech. Bioeng. 29, 130.*

41. Shindhelm, K., Nordon, R. (1999). Ex vivo cell therapy. *Academia Press.*

42. Shügerl, K. (1991). Bioreaction Engineergin. Vol. 1 y 2. John Wiley & Sons.

43. Sommerer, J.C., Ott, E. (1993). Particles floating on a moving fluid: A dynamically comprehensible physical fractal. *Science, 259, 335.*

44. Unger, D.R., Muzzio, F.J., Aunins, J.G., Singhvi, R. (2000). Computational and experimental investigation of flow and fluid mixing in the roller bottle bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering, 70, 117.*

45. Vrábel, P., Van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M., Boon, L., Nienow, A.W. (2000). Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modeling and measurements. *Chemical Engineering Science, 55, 5881.*

46. Weber, W., Rinderknecht, M., Daoud-El Baba, M., Glutz, F-N., Aubel, D., Fussenegger, M. (2004). CellMAC: a novel technology for encapsulation of mammalian cells in cellulose sulfate/pDADMAC capsules assembled on a transient alginate/Ca_{2+} scaffold. *Journal of Biotechnology, 114, 315.*

47. Weiss, S., John, G.T., Klimant, I., Heinzle, E. (2002). Modeling mixing in 96-well micro plates observed with fluorescence indicators. *Biotechnology Progress, 18, 821.*

48. Williams, K.A., Saini S., Wick, T.M. (2002). Computational fluid dynamics modeling of Steady-State momentum and mass transport in a bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Prog, 18, 951.*

49. Wright, P.C., Stevenson, C., McEvoy, E., Grant Burgess, J. (1999). Opportunities for marine bioprocess intensification using novel bioreactor design: frequency of barotolerance in microorganisms obtained from surface waters. *Journal of Biotechnology, 70, 343.*

50. Yeoh, S.L., Papadakis, G., Yianneskis, M. (2005). Determination of mixing time and degree of homogeneity in stirred vessels with large eddy simulation. *Chemical Engineering Science, Article in press.*

51. Zalc, J.M., Álvarez, M.M., Muzzio, F.J., Arik, E. (2001). Extensive validation of computed laminar flow in a stirred tank with three Rushton turbines. *American Institute of Chemical Engineers Journal, 47, 2144.*

52. Zalc, J.M., Szalai, E.S., Álvarez, M.M., Muzzio, F.J. (2002). Using CFD to understand chaotic mixing in laminar stirred tanks. *AIChE Journal, 48, 2124.*