

Desenvolvimento e instalação de circuito de gases para mini-bioreator

Pedro Cavalcante Frizarini¹, Serguei Balachov², Daniela Ribeiro³

pc.frizarini@unesp.br, serguei.balachov@cti.gov.br,
daribeiro@cti.gov.br

**³Divisão de Nano, Microssistemas e Materiais – DINAM
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP**

**²Divisão de Tecnologias para Produção e Saúde - DTPS
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP**

Resumo. *O artigo aborda o desenvolvimento e a instalação de um sistema de controle de gases para um mini-biorreator, projetado para cultivar células aderentes em condições controladas. Com base na infraestrutura existente, o sistema foi adaptado para fornecer um ambiente com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C, necessário para o crescimento adequado das células animais. Foram instaladas válvulas e filtros de linha de 0,22 micrômetros para garantir a esterilidade e a precisão do controle de gases. Os testes de vedação confirmaram a eficácia do sistema, sem vazamentos detectados, assegurando um ambiente estéril e eficiente para a biotecnologia. A implementação bem-sucedida do sistema destaca sua importância para aplicações laboratoriais e pesquisa em cultivo celular.*

1. Introdução

Segundo Doran (1995), um biorreator é "um vaso ou recipiente em que organismos vivos, células ou seus componentes, como enzimas, são utilizados para realizar uma reação bioquímica. Biorreatores são projetados para oferecer um ambiente adequado para a produção de produtos biológicos em larga escala, fornecendo controle sobre parâmetros como temperatura, pH, concentração de nutrientes e níveis de oxigênio."

Entretanto, esse conceito, apesar de fundamental, apresenta possibilidade de expansão e ressignificação no ponto de vista de suas aplicações miniaturizadas. Um mini-bioreator (MBR) apresenta possibilidades de realizar o cultivo de células em ambientes significativamente menores, porém com a mesma eficiência.

Um grande gargalo dos MBRs é justamente no monitoramento das variáveis associadas ao cultivo celular, em especial células animais, uma vez que são significativamente mais exigentes que células procariotas ou leveduras em geral. Dentro desse contexto, alternativas como a aplicação de MBRs de bancada em escalas próximas a 10 mL surgem, porém carecem de potenciais parâmetros de monitoramento para células aderentes, por exemplo. (EPPENDORF, 2020).

Metodos modernos de estudo de processo de crescimento de células frequentemente necessitam um controle em tempo real de processo, que significa, que

além das condições para crescimento o MBR tem que proporcionar os canais de entrada e saída de sinais RF e DC para garantir medidas *em-citu* de parâmetros.

Um dos desafios de desenvolvimento de um MBR, que permita o crescimento de células aderentes e atenda às suas necessidades de cultivo, é desenvolver o sistema que permite manter dentro da atmosfera controlável de CO₂.

Tradicionalmente, células animais necessitam de uma concentração de 95% O₂ e 5% CO₂ em ambiente úmido à 37°C para crescerem. Esse ambiente, é disponibilizado por meio de incubadoras aquecidas e vedadas, onde a temperatura interna é gerada por uma resistência elétrica e mantida, assim como os gases, por uma vedação hermética de borracha.

2. Base teórica de instalação de linha de gás para MBR

As incubadoras tradicionais contam com um sensor de CO₂, mas no caso MBR, por falta de espaço esta solução não é viável. Por isso foi proposta uma estratégia baseada no fato que MBR, uma vez sendo fechada não será aberta até fim do experimento. Por isso se bombear quantidade de CO₂ necessário no início do experimento, depois, durante o experimento não é necessários ajustes adicionais, sendo que consumo de CO₂ pelas células é muito menor (que normalmente acontece) do que o volume da câmara de bioreator.

A justificativa teórica deste método segue a lei da pressão parcial de Dalton. Trata-se de uma lei fundamental da físico-química que descreve o comportamento dos gases ideais em uma mistura. A lei afirma que, em uma mistura de gases ideais, a pressão total exercida é igual à soma das pressões parciais de cada gás individual. A pressão parcial de um gás é a pressão que o gás exerceria se estivesse sozinho no volume ocupado pela mistura. Conforme a lei fundamental de Dalton (ATKINS, 2010).

$$P_{Total} = P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n \quad (1)$$

Onde P_{Total} é a pressão total da mistura de gases, e P_1, P_2, P_3, P_n são as pressões parciais dos gases individuais na mistura. A pressão parcial de cada gás é proporcional ao número de moles desse gás na mistura e pode ser calculada como

$$P_i = x_i \cdot P_{Total} \quad (2)$$

Onde, x_i é a fração molar do gás i na mistura.

Segundo (1-2) se preencher um volume com x_i moles de gás com índice “ i ” a pressão total no reator sobre a concentração deste gás será $X\%$ mesmo que depois durante a execução do experimento a temperatura vá mudar.

Em nosso caso 5% de CO₂ tem que ser bombeado dentro do bioreator. O dióxido de carbono é necessário para manter o equilíbrio ácido-base no meio de cultura das células. A pressão parcial de CO₂ é ajustada para cerca de 5% da pressão total dentro da incubadora, o que ajuda a estabilizar o pH do meio juntamente com a presença das soluções tamponantes nos meios de cultura. Considerando a pressão total de 1 atm, a pressão parcial de CO₂ seria 0,05 atm.

Justamente para mimetizar esse ambiente os MBRs aplicam estratégias semelhantes de temperatura e vedação, porém a alimentação dos gases também deve ser realizada de maneira estéril e respeitando a disponibilizando pressão parcial de CO₂ e O₂.

3. Materiais e métodos

Objetivo deste trabalho e projetar e instalar uma linha de gás CO₂ para um mini dentro de ambiente que já existe no CTI. A linha a ser projetada tem que sair de ambiente estéril e ter uma ponta de eabastecimento para bioreator em um ambiente comum.

3.1. Diagrama de blocos do Sistema e controle de gases

Previamente a instalação, o sistema de CO₂ da sala de cultura apresenta uma ramificação direta da entrada de CO₂, conectada a um fluxômetro e distribuída para duas estufas disponíveis, conforme observado na Figura 1.

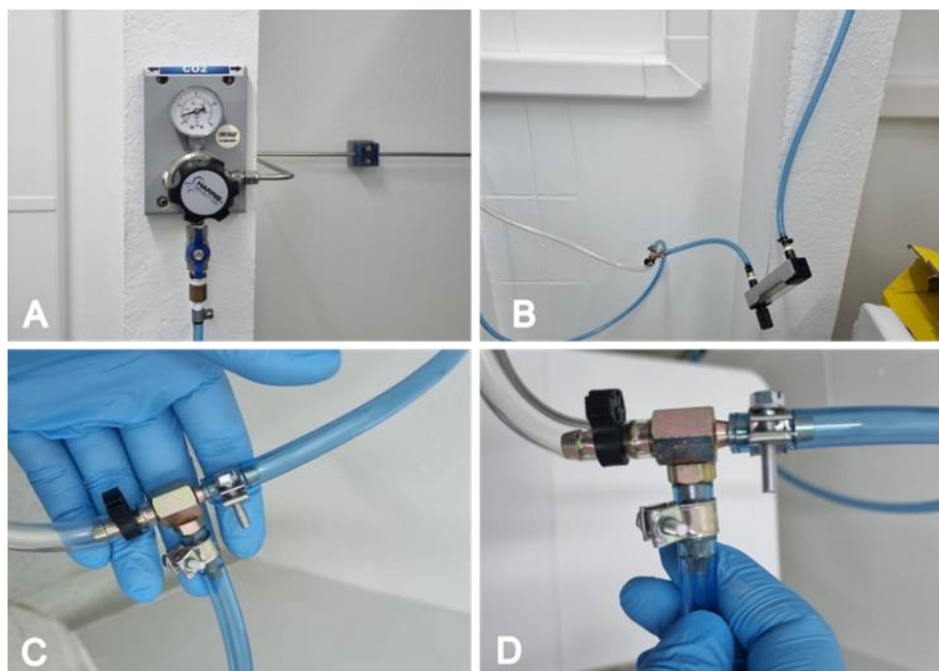


Figura 1 - Instalação Anterior .A)Foto da entrada de CO₂ (tubo de aço cinza), válvula central e os tubos de CO₂ direcionados para a estufa. B) Fluxômetro instalado previamente na parede, que recebe a saída da válvula central e ramifica para as estufas. C) Ramificação em “T” para as estufas. D) Detalhamento das presilhas plásticas usadas para a vedação do sistema.

Visando recondicionar a linha de gases já disponível no CTI - Renato Archer, foi dimensionado um sistema que utilize a linha de CO₂ já disponível e somente adapte o diâmetro dos tubos e a esterilidade do processo até o mini-bioreator. Essa adaptação está descrita na Figura 2, indicando o diagrama de blocos das instalações a serem feitas.

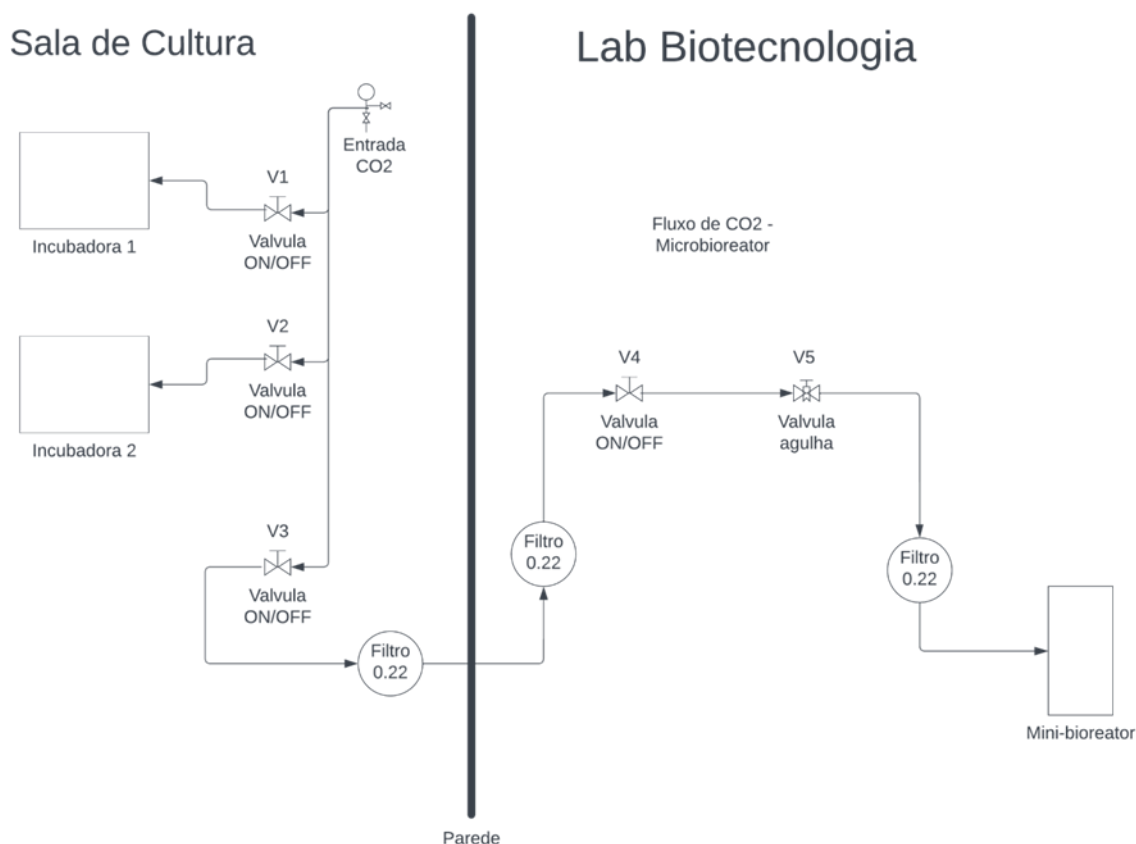


Figura 2 - Diagrama de blocos instalação CO₂

Na região denominada Sala de Cultura uma adaptação será realizada por meio de um acoplamento direto da válvula central aplicando três válvulas ON/OFF (*Swagelok® Multipurpose Ball Valves with Yor-Lok Fittings*), sendo duas para direcionadas para as incubadoras e outra comandando a linha de gás direcionada até o mini-bioreator.

Na parcela denominada Lab Biotecnologia foi instalado duas válvulas pneumáticas para o controle da entrada de gás do mini-bioreator, conforme indicado no diagrama. O sistema de válvulas é composto por uma válvula ON/OFF *Swagelok Ball and Quarter-Turn Plug Valves Medium Flow Metering Valve, 1/4 in* e uma válvula agulha *Stainless Steel Medium Flow Metering Valve, 1/4 in. Male Swagelok*, ambas disponibilizadas pelo CTI - Renato Archer.

3.2. Instalação de linha de gases para mini-bioreator

3.2.1. Instalação de filtros

Para manter a esterilidade do sistema foram aplicados filtros de linha de CO₂ a base de membrana 0.22 um em suportes de aço inox em dois setores da instalação, na

sala de cultura e na sala de biotecnologia. O primeiro filtro foi instalado junto as válvulas ON/OFF da sala de cultura, possível ser observado na Figura 3, o segundo junto ao perfilado plástico da sala de biotecnologia, observado na Figura 6 e o último estaria junto ao MBR.

3.2.2.Instalação sala de cultura

Buscando recondicionar a instalação anterior e torná-la mais eficiente (Figura 3) foram aplicados novos adaptadores em “T” de latão, três válvulas ON/OFF e o acoplamento direto de um filtro, conforme observado na Figura 3.

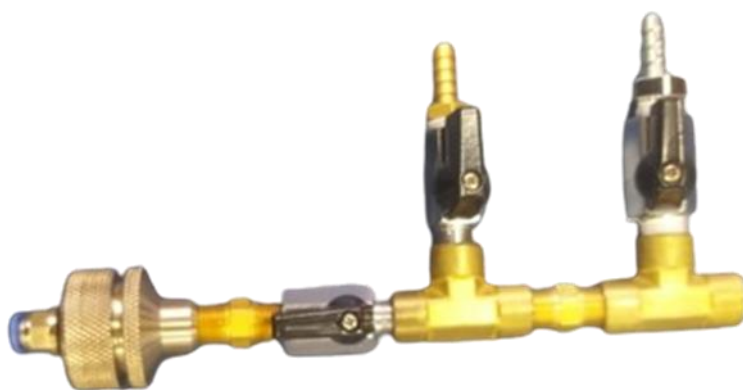


Figura 3. Parte mecânica de linha de CO₂ instalada na sala de cultura.

O sistema de distribuição de gases é constituído por três válvulas ON/OFF (*Swagelok® Multipurpose Ball Valves with Yor-Lok Fittings*), dois adaptadores em “T” de estanho e um adaptador de estanho para a instalação do filtro acoplado ao sistema, esse que será direcionado para o MBR.

3.2.3.Instalação laboratório de biotecnologia

Para realizar a interface entre o laboratório de biotecnologia e a sala de cultura, seria necessário aplicar um suporte para abrigar as válvulas ON/OFF e agulha. Utilizando um perfilado profundo de aço inox em “U” com 600x2,5 mm (Código IC-CNL-D-S-SL6-55-2,5) com adaptações para abrigar as respectivas válvulas, é possível observar o perfilado com as furações realizadas na Figura 4.



Figura 4 - Perfilado com as Válvulas

O perfilado foi cortado em um comprimento de 240mm e dois furos de 22mm de diâmetro para abrigar as válvulas. Por conta das diferentes alturas das válvulas aplicas foi necessário realizar a furação em planos diferentes, sendo o plano frontal (oposto a parede) abrigando a válvula ON/OFF e o plano superior abrigando a válvula agulha, conforme observado na Figura 5.

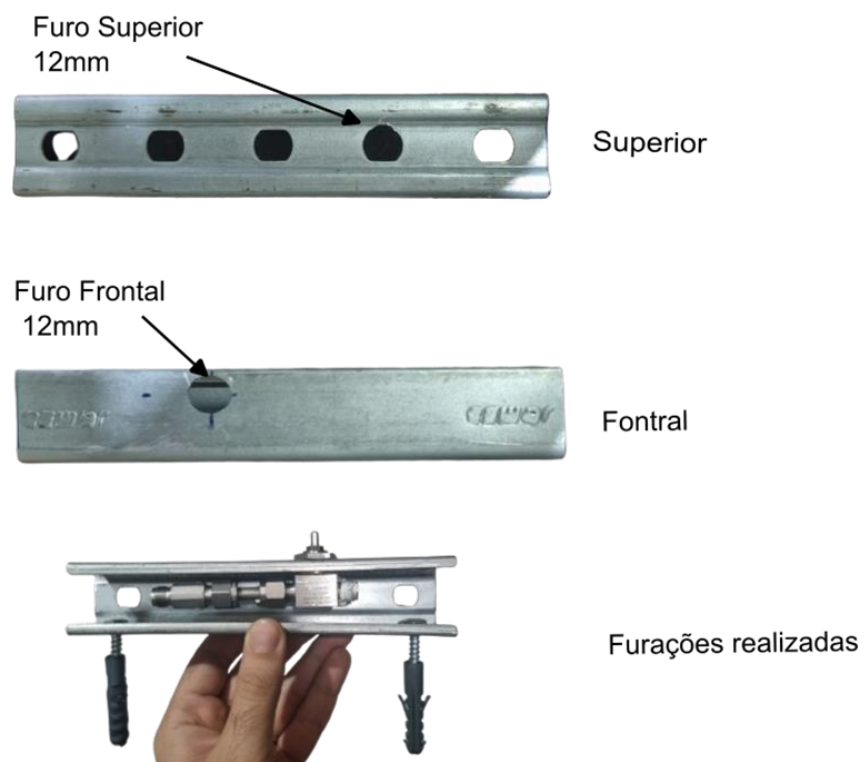


Figura 5 - Desenho dos Furos Perfilado

Não somente a altura necessitou de uma adaptação, mas também a aplicação de um calço de estanho para impedir manter os canos internos retos, foi fabricada e instalada em conjunto com o conjunto de válvulas, conforme observado na Figura 5. Dois furos também foram realizados no plano paralelo à parede para abrigar dois parafusos de 8 para fixação da instalação, conforme observado na Figura 6.



Figura 6 - Instalação do Perfilado e Filtro

4. Resultados e discussão

4.1. Testes de linha de gases

O teste da linha de gases foi realizado inicialmente por meio da checagem das vedações por água e sabão visando identificar possíveis vazamentos de gás. Conforme observado na Figura 7, após a instalação do sistema correspondente a sala de cultura o sistema de gases foi esvaziado. Em seguida, a solução contendo sabão de água foi adicionada em todas as ligações isoladas com veda-rosca buscando observar o aparecimento de bolhas – indicativos de vazamentos.



Figura 7 – Teste de Vedação Sala de Cultura

Entretanto não foi observado nenhum vazamento de CO₂ após repetidos testes de esvaziamento nem perda de pressão na linha instalada, observado pela permanência do ponteiro do manômetro na pressão indicada 30bar.

5. Conclusão e considerações finais

O artigo conclui que a adaptação e instalação do novo sistema de gases para o mini-biorreator foram bem-sucedidas, atendendo aos requisitos de crescimento das células aderentes em um ambiente controlado. Os testes de vedação realizados mostraram que não houve vazamento de CO₂, garantindo a eficácia e a segurança do sistema instalado. A abordagem proposta oferece uma solução eficiente e prática para o cultivo de células animais, destacando a importância de um controle rigoroso das condições ambientais e dos gases em MBRs. A instalação desse sistema no mini-biorreator representa uma contribuição significativa para a biotecnologia, permitindo a expansão do uso de MBRs em aplicações laboratoriais e de pesquisa.

6. Referências bibliográficas

EPPENDORF. **Bioreactors and Fermentors— Powerful Tools for Resolving Cultivation Bottlenecks**. 2020. Disponível em: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/806599/Fermentors-Bioreactors_White-Paper_021_Stirred-tank_bioreactors_Bioreactors-Fermentors-Powerful-Tools-Resolving-CultivationBottlenecks.pdf. Acesso em: 29 ago. 2024.

ATKINS, Peter. **Physical Chemistry**. 9. ed. New York: W.H. Freeman And Company, 2010. 1010 p.

SHULER, Michael L.. **Bioprocess Engineering**. 2. ed. New Jearsey: Prentice Hall Ptr, 2002. 576 p.

DORAN, Pauline M.. **Bioprocess Engineering Principles**. Sydney: Elsevier Science & Technology Books, 1995. 430 p.

BETTS, Jonathan I; BAGANZ, Frank. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 21, 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-5-21>.