

# Análisis de Tecnologías más Utilizadas en Incubadoras de CO<sub>2</sub>

M.A. Alam Cepero<sup>1</sup>, Y. Pérez Rosales<sup>2</sup>, Y. Hernández Vicens<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Servicios Técnicos Electromedicina, Lic. Tecnología de la Salud, Matanzas, Cuba

<sup>2</sup> Servicios Técnicos Electromedicina, Ing. Biomédica, Matanzas, Cuba

<sup>3</sup> Servicios Técnicos Electromedicina, Ing. Biomédica, Matanzas, Cuba

**Abstract—** The cell and tissue culture, such as: IVF, oncology and studies of stem cells, in a controlled environment is highly dependent on CO<sub>2</sub> incubators. Those equipment differ greatly from conventional incubators, due to the fact that it's internal environment is strictly controlled (CO<sub>2</sub>, concentration, temperature, relative humidity, and sometimes O<sub>2</sub> concentration). It can be done using different technologies. The main aim of this work is to get some tools to understand and to know how to choose the best equipment in each application.

**Palabras claves—** Incubadoras, CO<sub>2</sub>, temperatura, humedad.

## I. INTRODUCCIÓN

En el mundo actual de la Biotecnología tienen cada vez más importancia las técnicas de cultivo celular. Estos procedimientos, debido a su gran complejidad, requieren de condiciones ambientales muy específicas que permitan lograr los crecimientos deseados. Estos ambientes se logran en las incubadoras de CO<sub>2</sub> (Figura 1), que son equipos que se diferencian de las de uso común fundamentalmente en que tienen una atmósfera en la que se controla el por ciento de CO<sub>2</sub> presente. Estos equipos están compuestos principalmente por una cámara que contiene aperturas para la entrada de aire, CO<sub>2</sub> y para la toma de muestras, en la cual se efectúa el proceso fundamental para el cual es destinado el equipo; incubación y crecimiento de células y tejidos. Además, poseen un panel o bloque de control que permite la selección de las distintas funciones, entre las que se encuentran los ajustes de temperatura de incubación, de concentración de CO<sub>2</sub>, de humedad relativa, en el caso en que estén presentes, tiempos de arranque, incubación y parada, así como los respectivos valores de alarma [1].

La cámara de incubación está rodeada por una camisa o *jacket* que en función del tipo de incubadoras puede estar lleno de agua, o aire y una resistencia calefactora que estará adherida a las paredes exteriores de la cámara de incubación. Es necesario además que el *jacket* esté separado del exterior por un aislamiento térmico para disminuir al máximo la interacción de la temperatura ambiente con la de la incubadora. Una parte importante son los elementos de potencia (resistencias eléctricas) que son los encargados de suministrar energía para mantener constante la temperatura.

Este tipo de incubadoras debe realizar un conjunto de funciones que permitan un adecuado ambiente. Para ello se debe controlar el CO<sub>2</sub>, la temperatura y la humedad [1] [2].

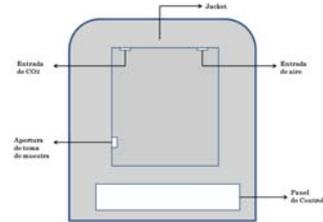


Fig. 1 Esquema general de las incubadoras de CO<sub>2</sub>

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

En la implementación de cada una de las funciones de las Incubadoras de CO<sub>2</sub> existen varias tendencias que presentan ventajas y desventajas entre ellas. A continuación se realiza un análisis de cada una de ellas, fundamentalmente en cuanto al control de CO<sub>2</sub>, de la temperatura y la humedad.

### A. Control de CO<sub>2</sub>

Los niveles de CO<sub>2</sub> dentro de la cámara se establecen con un punto de ajuste donde se controla que este se mantenga. Cuando se abre la puerta, se libera CO<sub>2</sub> y un sensor detecta las variaciones en el nivel de este. Automáticamente se inyecta CO<sub>2</sub> para compensar el nivel hasta el punto de ajuste. El sistema de control generalmente corresponde a un algoritmo PID (Proporcional Integral Derivativo) controlando este por ancho de pulso la posición del elemento final de control, es decir, en la solenoide, cuando mayor sea la diferencia entre el punto de ajuste y el valor real, más tiempo durará la inyección del gas, a medida que se va aproximando al punto de ajuste, más se irá acortando el tiempo de inyección, generalmente con la inyección solamente no se logra el punto de ajuste perfecto, pues el volumen de gas suministrado puede variar por factores como: ligeros cambios de la presión del regulador de CO<sub>2</sub> a la salida del cilindro, para compensar este efecto si el valor real de CO<sub>2</sub> reba-

sa el punto de ajuste, existe un pequeño compresor de aire que suministra un pequeño volumen para compensar el exceso de CO<sub>2</sub>, también cada una hora se suministrará una pequeña cantidad de aire por este compresor para eliminar cualquier exceso de CO<sub>2</sub> causado por la generación de este gas en el mismo proceso de cultivo celular y por la variación de la resistencia al flujo de la línea de suministro que puede variar por la longitud o por el diámetro interno, así como por la obstrucción de los filtros HEPA (Filtro de partículas). Dependiendo de estos requerimientos existen varios métodos de control de CO<sub>2</sub>, que a continuación serán descritos [3] [4] [5].

*Conductividad térmica (TC):* El sistema de conductividad térmica funciona midiendo la diferencia de resistencia entre dos termistores (tipo de sensor de temperatura), uno expuesto al entorno de la cámara y el otro encerrado o en contacto con un flujo de aire de referencia, tanto el flujo de aire donde se realizará la medición de CO<sub>2</sub>, como el de referencia deben estar exactamente a la misma temperatura, ya que el principio de funcionamiento de este tipo de instrumento se basa en la diferencia de conductividades térmicas entre el CO<sub>2</sub> y el aire atmosférico, el CO<sub>2</sub> tiene una conductividad térmica menor (0,71) que el aire atmosférico, y como este tiene un valor de 0.03% de CO<sub>2</sub>, toda muestra que contenga un por ciento mayor tendrá menor conductividad térmica, por lo que extraerá menos calor de la termorresistencia de la rama del puente que corresponda al flujo de gas a medir, lo que desequilibrará un puente balanceado, siendo el desequilibrio proporcional a la diferencia en concentración de CO<sub>2</sub> entre las dos ramas del puente. La presencia de CO<sub>2</sub> en la cámara modifica la resistencia entre los dos termistores. Se determina el nivel de CO<sub>2</sub> midiendo la resistencia.

Una desventaja del sistema de conductividad térmica es que la precisión del sensor se puede ver afectada por cambios en la temperatura y en la humedad relativa. Abrir la puerta con frecuencia genera fluctuaciones en la temperatura y en la humedad relativa, además de los niveles de CO<sub>2</sub> y esto puede afectar la precisión de la conductividad térmica del sensor.

*Infrarrojo (IR):* El sistema infrarrojo se desarrolló como alternativa al sensor de TC y es un controlador más preciso de los niveles de CO<sub>2</sub>. El sistema infrarrojo detecta los niveles de CO<sub>2</sub> con un sensor óptico. Una muestra de aire de la cámara pasa entre un emisor infrarrojo (una fuente de luz) y el sensor. El sensor detecta una reducción en el IR del emisor cuando el CO<sub>2</sub> de la muestra de aire absorbe el IR. La cantidad de IR absorbida se relaciona con los niveles de CO<sub>2</sub> de la muestra de aire. El sensor de IR es menos afectado por variaciones de temperatura y humedad, por lo que es

más preciso que el sensor de TC, especialmente después de abrir la puerta. Sin embargo, el sistema IR suele ser más costoso que el sistema de TC. Siempre se debe evitar la condensación de las paredes de la incubadora, ya que esto puede ser una causa de errores de lectura en las concentraciones, y también una indicación de que la temperatura no está homogeneizada en las paredes de la cámara [1] [3] [4] [5].

## B. Control de temperatura

*Camisa de agua:* Las incubadoras con camisa de agua (Nuair) mantienen la temperatura rodeando la cámara interior con agua calentada en un compartimento separado. El agua se calienta y circula alrededor de la cámara interior por convección natural. El calor del agua se irradia a la cámara interior manteniendo una temperatura constante en el interior. El agua es un medio almacenador de energía particularmente eficaz y el sistema de camisa de agua se considera el método más confiable de calentamiento en caso de corte de energía, esto es debido a la gran entalpía que posee el agua, la mayor de todas los elementos disponibles. En este último caso, una incubadora con camisa de agua mantendrá una temperatura fija en el interior de la cámara durante un tiempo de 4 a 5 veces mayor que una unidad con paredes radiantes, en caso de fallo de la energía.

Presentan dos inconvenientes básicos, uno es que de la misma forma en que almacena gran cantidad de energía, también hay que suministrarle esa energía para elevar la temperatura, por lo que tardará en ocasiones hasta más de 24 horas en estabilizarse a la temperatura de trabajo, siendo extremadamente crítico el sistema de control de temperatura, pues si esta pasa el punto de ajuste, será una desviación que tomará demasiado tiempo en ser compensada, pudiéndose dañar el proceso que se realizaba. Es necesario también, tener la precaución de cambiar el agua cada cierto tiempo, aunque si se utiliza de forma destilada y un correcto biocida este tiempo puede ser tan largo como semestral [2] [3] [5].

*Paredes radiantes:* Las incubadoras con paredes radiantes (Hirayama, Biotech, Sanyo) calientan la cámara interior mediante calentadores montados en la cavidad circundante, que irradia calor a través de la cámara interna. Un sistema de calentamiento por paredes radiantes permite una rápida recuperación de la temperatura después de abrir la puerta o de cambios en los valores de temperatura.

Los sistemas de calentamiento por paredes radiantes son más simples para el usuario, ya que no requieren el llenado, monitoreo y vaciado de la camisa de agua [1].

*Resistencias eléctricas:* En el sistema de calentamiento por flujo de aire caliente, se simplifica la conexión de las resistencias eléctricas a las paredes exteriores de la cámara, y se logra una temperatura homogénea de forma rápida, mas hay que chequear que no se cree ningún efecto de succión debido a alguna entrada de aire al espacio entre las paredes exteriores de la cámara y la cubierta exterior, ya que esto crearía áreas de enfriamiento, con la consecuente no homogenización de temperatura y la creación de áreas de condensación que pueden tener cierta interferencia con la medición de la concentración del gas.

También, de forma independiente se calienta la puerta, por una resistencia colocada en el interior de la misma, para de esta forma homogeneizar también la temperatura en el frente de esta.

La medición de la temperatura se lleva a cabo generalmente mediante termoresistencias de Platino, (PT 100), o en otros casos, mediante termoresistencias semiconductoras tipo NTC. En casos de modernos equipos con control a microprocesador, se mide tanto la temperatura interna de la cámara, como la del exterior, para poder generar una señal de control que sea capaz de compensar la salida de potencia a los elementos calefactores, antes de que una variación de la temperatura exterior tuviese algún efecto indeseado en la temperatura del interior de la cámara de incubación.

En algunos modelos se puede instalar un ventilador fuera del área de cultivo para contribuir a la circulación del aire dentro de la cámara sin alterar los cultivos. Esta suave circulación acelera la recuperación de la temperatura interna como de los niveles de CO<sub>2</sub> y de humedad después de abrir la puerta. Existen aplicaciones donde esta opción no es recomendable, porque siempre puede implicar un riesgo de contaminación cruzada entre las diferentes muestras, debiéndose valorar la homogenización de la mezcla de CO<sub>2</sub> con el aire, ya que al ser este más denso que el aire, si la incubadora está muchas horas, incluso días sin utilizarse, puede ocurrir que el CO<sub>2</sub>, al ser 1,5 veces más denso que el aire se asiente mayormente en el fondo de la incubadora, por tanto reciben una mayor concentración las muestras que estén ubicadas en el fondo que las que estén situadas en la parte superior [1] [3].

### *C. Humedad. Protección de los cultivos contra la desecación*

La desecación es un factor que genera problemas en los cultivos de células. Es importante mantener niveles adecuados de humedad dentro de la cámara para evitar el secado de los cultivos. Las grandes incubadoras de CO<sub>2</sub> pueden usar generadores de vapor o atomizadores para controlar los niveles de humedad relativa, pero la mayoría de las incubadoras pequeñas o medianas usan bandejas para generar

humedad mediante evaporación, aunque también algunos modelos utilizan sistemas de humidificación activos. Las bandejas producen niveles de humedad relativa entre 95% y 98%. Algunas incubadoras tienen depósitos de humedad con agua en bandejas calientes, lo que aumenta la evaporación. Un depósito de humedad puede aumentar los niveles de humedad relativa de 97% a 98%, pero este sistema es más complicado y podrían surgir problemas debido a un aumento en la cantidad de componentes y esas unidades podrían tender a producir una transpiración interna. Otros sistemas miden la humedad relativa en el interior de la incubadora, esto lo hacen de varias formas, a través del conocido sistema de bulbo húmedo y bulbo seco, o más generalmente, a través de sensores electrónicos de humedad contruidos especialmente con ese objetivo, tales como las celdas de cloruro de litio que consiste en una celda embebida en cloruro de litio con una rejilla de láminas de oro, la sal tiene la propiedad de variar su resistencia al aumentar o disminuir la humedad ambiente ya que libera o absorbe iones de la película soporte, como la humedad relativa está determinada simultáneamente por el contenido de humedad y por la temperatura del aire, es obvio que es necesario compensar esta. Este elemento no puede utilizarse en atmósferas con polvo, dióxido de azufre, vapores ácidos, amoníaco, cloro, vapores alcalinos, acetileno, óxido de acetileno y atmósferas contaminadas con sal. El elemento envejece, disminuyendo su indicación en 1% a 2% por año. La precisión suele ser de más menos dos a tres por ciento y su rango de trabajo de 5% a 95% de humedad relativa. En función del grado de humedad relativa fijado en el punto de ajuste, si la incubadora tiene esta opción, se permitirá la vaporización de una pequeña cantidad de agua para lograr el punto deseado. En estos casos no deberá existir una bandeja con agua en la incubadora, ya que la presencia de esta llevará a una humedad relativa equivalente a la existente a vapor prácticamente saturado a la temperatura de incubación (37 grados centígrados, la más común) y presión atmosférica.

También se puede medir la humedad relativa por analizadores de infrarrojos, algo similar al método de la medición del CO<sub>2</sub>, pero en este caso a una longitud de onda que sea más propia del vapor de agua y por métodos de capacidad, que se basa en la variación de la constante dieléctrica que el material experimenta entre el estado húmedo y el estado totalmente seco [4] [5].

### *D. Material de la cámara*

En este aspecto se debe tener en cuenta la calidad del acero que conformen la cámara de incubación, el cual debe ser de acero inoxidable, de una superficie bien pulida y con el menor número de protuberancias posibles; al igual que las bandejas donde se colocan las muestras, ya que cual-

quier área de corrosión facilitaría la contaminación por el crecimiento de microorganismos no deseados, dificultando así la limpieza [1] [6].

### E. Contaminación

La contaminación es una fuente importante de fracaso en el cultivo de células. Los fabricantes de incubadoras de CO<sub>2</sub> han hallado maneras de ayudar a combatir este problema. La reducción de las áreas o superficies donde pueden crecer los microorganismos y la incorporación de ciclos de descontaminación automática son algunos de los métodos que ayudan a los investigadores a evitar la contaminación. Otros, también ofrecen filtros HEPA en las incubadoras de CO<sub>2</sub> para reducir la contaminación durante el ciclo de incubación. Las cámaras revestidas en cobre con estantes y accesorios de cobre también reducen el crecimiento de hongos y otros contaminantes. Los estantes desmontables e interiores sin fisuras o rincones cerrados en cámaras internas recubiertas reducen las áreas donde pueden crecer los contaminantes. Las superficies también son más accesibles para el uso de desinfectantes. Algunas incubadoras de CO<sub>2</sub>, cuentan con ciclos que descontaminan la cámara interna entre ciclos de incubación. La descontaminación automática funciona aumentando la temperatura interna a + 90 grados centígrados durante varias horas, eliminando así los microorganismos contaminantes, otros plantean 120 grados centígrados durante 4 horas. El ciclo de descontaminación automática usada en conjunto con los filtros HEPA, tanto en la línea de suministro de aire como de CO<sub>2</sub> reduce enormemente la contaminación [1] [2] [7] [8].

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una incubadora de CO<sub>2</sub> debe ser fácil de usar y de mantener. Con la introducción de controles por microprocesadores se logra el óptimo autoajuste de los parámetros de control permitiendo su optimización, logrando una estabilidad tanto de temperatura como del por ciento de CO<sub>2</sub> sin la intervención del operador ni el técnico de servicio. El uso de estos controles permite además, la medición de la temperatura ambiente para conformar una señal de control que permita compensar por adelantado cualquier variación de la temperatura ambiente que cause una variación en la temperatura de incubación. Las funcionalidades tales como termostatos, alarmas de sobretemperatura, de CO<sub>2</sub>, de apertura de puerta, protección de configuración con contraseña,

autocalibración y ciclos de descontaminación automática, ofrecen facilidad de operación y seguridad al usuario.

En el caso de una limpieza total de la cámara se recomienda la utilización de peróxido de hidrógeno. Valorando esta opción debido a que es desinfectante y no contaminante.

## IV. CONCLUSIONES

Luego de haber analizado las partes que conforman la Incubadora de CO<sub>2</sub> y su funcionamiento se concluye que el sensor de CO<sub>2</sub> por Infrarrojo es el más recomendable. En cuanto a la utilización de camisas de agua o *jacket* de aire dependería fundamentalmente de las probabilidades de un fallo de energía en el lugar donde se encuentre instalado. La opción de medición y control de humedad relativa estará presente siempre que sea necesario mantener un intervalo de 40% a un 90%, si es necesario por encima de un 90% se utilizará la bandeja de agua. En el caso de estrictos requerimientos de esterilidad se sugiere la utilización de modelos que tengan la opción de desinfección térmica.

Se hace necesario la máxima atención a las prestaciones que se esperan del equipo y el costo que sea razonable pagar, teniendo un conocimiento del proceso de incubación que se va a realizar, y en los puntos en que este es más sensible a interferencias. Conociendo y analizando lo anteriormente expuesto, permite tener las herramientas mínimas que faciliten una eficiente elección.

## REFERENCIAS

1. Biotechniques Protocol Guide 2009 at <http://www.nbsc.com>
2. González J, González B. (2004) Laboratorio de microbiología, instrumentación y principios básicos
3. Preobrazhensky (1988) Mediciones termotécnicas y aparatos para realizarlas
4. Creus A (1992) Instrumentación Industrial
5. Considine D.M (1972) Encyclopedia of Instrumentation and Control
6. Bops W (2003) Instrumentation Reference Book
7. Bronzino J (2003) Biomedical Engineering Handbook
8. Enderle J (2005) Introduction to Biomedical Engineering

Autor: Manuel A. Alam Cepero  
Instituto: Centro de Electromedicina Provincial  
Calle: Callejón de Quintanales Final.  
Ciudad: Matanzas  
País: Cuba  
E-mail: [electromed.mtz@infomed.sld.cu](mailto:electromed.mtz@infomed.sld.cu)