



89  
27  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE PRODUCCION DE  
INSULINA HUMANA POR MEDIO DE BIOTECNOLOGIA  
A NIVEL INDUSTRIAL CON EL USO DE LA  
TECNOLOGIA U.N.A.M. (C.I.I.G.B.)

TESIS MANCOMUNADA

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO QUIMICO  
PRESENTADA POR  
LUIS BERNARDO DE LA ROSA PEREZ  
Y  
RODRIGO FAVELA FIERRO

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA EN CALIFICACION

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

<b>I Antecedentes:</b>	
<b>I.A La Diabetes Mellitus y su importancia.</b>	
I.A.1 Diabetes Mellitus	1
I.A.2 Causas de la Diabetes Mellitus.	2
I.A.3 Efectos sociales de la Diabetes Mellitus.	3
<b>I.B La Insulina.</b>	
I.B.1 Características de la Insulina	6
I.B.2 Función biológica de la Insulina	9
I.B.3 Síntesis biológica de la Insulina	10
I.B.4 Producción industrial de la Insulina	12
<b>I.C Producción de Insulina Humana por medio de Ingeniería Genética.</b>	
I.C.1 Esquema general.	14
I.C.2 Descripción de la Tecnología CIIGB-UNAM	15
I.C.2.a Síntesis química de los genes.	16
I.C.2.b Clonación molecular.	17
I.C.2.c Obtención de la Insulina por microorganismos modificados.	18
<b>I.D Bibliografía.</b>	21
<b>II Estudio de Mercado.</b>	
<b>II.A La Insulina como producto comercial.</b>	
II.A.1 Tipos de Insulina comercial y sus usos.	24
II.A.2 Alternativas al uso de insulina: sustituyentes	29
<b>II.B Los productores de Insulina.</b>	
II.B.1 Productores y distribuidores.	32
II.B.2 Importación y exportación.	35
II.B.3 Precios.	35
<b>II.C Consumo de Insulina en México.</b>	
II.C.1 Los consumidores.	36
II.C.2 Consumo aparente.	37
<b>II.D Elección del mercado.</b>	39
<b>II.E Bibliografía.</b>	45
<b>III Estudio técnico.</b>	
<b>III.A Descripción detallada de la tecnología.</b>	48
<b>III.B Bases de diseño.</b>	56
<b>III.C Análisis del sistema de producción.</b>	
III.C.1 Líneas de producción	61
III.C.2 Continuo/Lotes	63
III.C.3 Pasos de proceso en una escala mayor	64
III.C.4 Balances de materia y energía	66
III.C.5 Distribución de tiempos	77
<b>III.D Dimensionamiento y diseño técnico.</b>	
<b>III.D.1 Análisis técnico del escenario I.</b>	
III.D.1.a Preparación del inóculo	78
III.D.1.b Fermentación	79
III.D.1.c Concentración de células	85
III.D.1.d Homogeneización	89
III.D.1.e Clarificación y enriquecimiento.	92
III.D.1.f Cianogénolisis	94
III.D.1.g Sulfitólisis	97

III.D.1.h	Diafiltración	100
III.D.1.i	Cromatografía líquida de alta presión	103
III.D.1.j	Liofilización	105
III.D.1.k	Asociación de cadenas A y B	106
III.D.1.l	Cristalización	109
III.D.1.m	Equipo auxiliar	110
III.D.1.n	Acondicionamiento a la planta del CIIGB,	110
III.D.2	Análisis técnico del escenario II.	
III.D.2.a	Preparación del inóculo	112
III.D.2.b	Fermentación	113
III.D.2.c	Concentración de células	116
III.D.2.d	Homogeneización	118
III.D.2.e	Clarificación y enriquecimiento	118
III.D.2.f	Cianogénolisis	120
III.D.2.g	Sulfitólisis	121
III.D.2.h	Diafiltración	123
III.D.2.i	Cromatografía líquida de alta presión	124
III.D.2.j	Liofilización	124
III.D.2.k	Asociación de cadenas A y B	124
III.D.2.l	Purificación y cristalización	126
III.D.2.m	Equipo auxiliar	126
III.E	Bibliografía	128
IV	Evaluación económica del proyecto.	
IV.A	Planteamiento de problema.	134
IV.B	Evaluación del Escenario I (pruebas clínicas)	
IV.B.1	Inversión y Costos	138
IV.B.2	Análisis de Sensibilidad	141
IV.C	Evaluación del Escenario II (insulina rápida SSA)	
IV.C.1	Inversión y Costos	142
IV.C.2	Rentabilidad	142
IV.C.3	Análisis de Sensibilidad	143
IV.D	Bibliografía	145
V	Conclusiones	147
IV	Apéndices	
	Apéndice I	152
	Apéndice II	154
	Apéndice III	157

CAPITULO I  
ANTECEDENTES

I.A La Diabetes Mellitus y su importancia:

I.A.1 Diabetes Mellitus.

La Diabetes Mellitus es considerada como un síndrome de evolución crónica con fuerte predisposición hereditaria. En la cual existe una deficiencia de insulina, absoluta o relativa en la reserva pancreática, con la consiguiente disminución de la insulina circundante, esto ocasiona una alteración en el metabolismo intermedio. En diferentes etapas de su evolución provoca daños micro y macrovasculares, así como trastornos neurológicos (11).

Sus signos son la poliuria (volumen de orina superior al normal), la polidipsia (sed extraordinaria), y la polifagia (aumento anormal del apetito). Su tratamiento se realiza desde hace mas de sesenta años administrando insulina (en su caso) o estimuladores potentes de ésta.

La liberación de la insulina parece estar controlada por la interacción coordinada de la disponibilidad de productos alimenticios, hormonas gastrointestinales y otros estímulos hormonales.

Los diabéticos tienen dos serias anomalías en el metabolismo de Carbohidratos: la falta de liberación de insulina y la falla de inhibir la liberación de glucagón. Sobre una base molar el efecto del glucagón es varias veces mayor que el efecto de la insulina, por lo que se requiere

de dosis mayores de insulina para contrarrestar el efecto del glucagón (2).

#### I.A.2 Causas de la Diabetes:

La Diabetes Mellitus se ha considerado como una enfermedad que se ve expresada debido a la interacción entre la susceptibilidad hereditaria y factores ambientales. La contribución de cada uno de estos factores y su interacción no se ha documentado con precisión, pero se considera que ambos factores son multifactoriales y contribuyen en una proporción variable a la "mezcla diabética." En un extremo se encuentra una diabetes totalmente genética que se presenta a edades prematuras. En la figura 1 podemos ver el aumento de la probabilidad de tener Diabetes por herencia: desde un 20 %, teniendo un pariente diabético, hasta un 100 % teniendo padre y madre con Diabetes. En el otro extremo se encuentra la Diabetes Ambiental, que se ha incrementado recientemente. Cabe aclarar que, generalmente, la Diabetes Insulinodependiente es de tipo genético, mientras que para la otra es ciertamente lo contrario (10).

Los factores ambientales son de gran importancia en determinar la frecuencia y el tiempo de la aparición de Diabetes Mellitus. Así mismo, los cambios en las condiciones de vida pueden producir grandes cambios en la frecuencia de Diabetes. En el diabético que no es insulinodependiente, vejez, obesidad y multiparidad en mujeres inducen fuertemente la Diabetes.

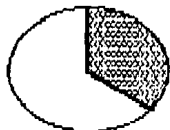
HERENCIA EN DIABETES  
PORCIENTO DE PROBABILIDADES

Si tiene un primo en primer grado  
Tía o tío  
Un abuelo o abuela  
Abuelos esposos, uno de los padres



20 %

Dos abuelos (no esposos)  
Padre y un primo hermano de la madre  
Madre y un primo hermano del padre



30 a 40 %

Padre y un familiar de la madre o vs.  
padre y un abuelo materno o madre  
y un abuelo paterno  
Padre, un familiar paterno y abuelo  
materno vs. Padre y madre 100 %



50 a 60 %

Figura 1 (Steindberg)

Se ha reportado que la migración de poblaciones ha contribuido en un aumento considerable de el índice de Diabetes hasta más de 20 veces. En el caso del sexo se ha reportado una variación considerable: a principios del siglo XX existía una mayoría de diabetes en los hombres, y en el transcurso del siglo, cambió a una mayoría en mujeres. Ahora la tendencia es que aumente nuevamente en los hombres. (10)

La obesidad es un factor determinante en la cantidad de diabéticos de una población. Es más probable la muerte en un diabético si presenta avanzada edad y obesidad, pero también se sugiere que no es la obesidad por sí misma, sino la composición de la dieta del diabético. Se ha reportado que la deficiencia en cromo trivalente y fibras vegetales puede ser un índice en la formación de Diabetes Mellitus (10). Por último, la multiparidad está relacionada directamente con la aparición de Diabetes Mellitus (10).

En la génesis de la Diabetes Insulinodependiente los factores ambientales, especialmente las infecciones juegan un papel fundamental.

### I.A.3 Efectos Sociales de la Diabetes:

A nivel mundial la Diabetes Mellitus ha sido objeto de importantes campañas médico-gubernamentales, ya que representa un problema de magnitud considerable tanto desde el punto de vista de morbilidad como de mortalidad, teniendo éstas un elevado coeficiente de incapacidad.



## Tasa de mortalidad para Diabetes Mellitus en México

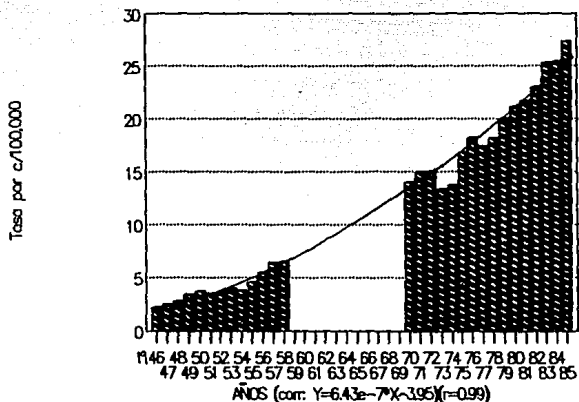


Figura 2 Estudios de: Zubirán (1960) y Fanghanel (1985)

La diabetes mellitus es una de las diez enfermedades más importantes en México. En la figura 2 se puede observar el crecimiento tan acelerado en la tasa de mortalidad de la Diabetes, en esta gráfica se presentan dos estudios realizados en etapas muy diferentes que presentan una correlación sorprendentemente buena.

En comparación con la Tumores malignos y enfermedades del corazón la tasa de la Diabetes es menor, pero el crecimiento de la misma es mucho más pronunciado. En la figura 3 podemos observar claramente que la relación de tasas de mortalidad de otras enfermedades con respecto a la Diabetes ha disminuido notablemente.

En E.U. esta enfermedad crónica es una de los mayores problemas de salud pública, ocupando el octavo lugar en una escala de padecimientos mas frecuentes (se presenta en nueve de cada mil habitantes). La frecuencia de la Diabetes esta, sin duda, ligada a factores socioculturales, económicos, y a las mejores condiciones sociales en que se viva, existiendo una relación directa entre la aparición de esta enfermedad y el desarrollo de cada país (12). Como se puede apreciar en la figura 4, la tasa de mortalidad para Diabetes Mellitus en Estados Unidos es tres y nueve veces mayor respecto a México y a Guatemala.

En 1980 se calculó que existían 50 millones de diabéticos en el mundo. En 1968 se estimaba que el 2% de la población mundial presentaba Diabetes Mellitus. Para 1979 se estimó que el porcentaje había aumentado a un 5.6% (11).

### IMPORTANCIA RELATIVA DE LA DIABETES EN MORTALIDAD EN LA REPUBLICA MEXICANA

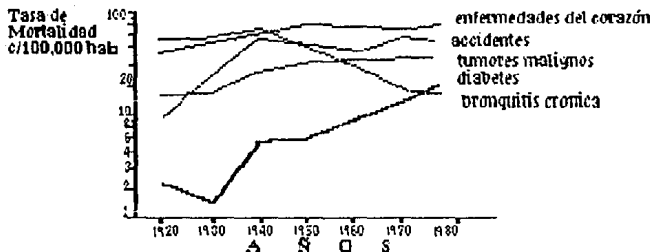


Figura 3 (SSA, 1979)

### COMPARACIÓN DE LA TASA DE MORTALIDAD PARA DIABETES MELLITUS PARA VARIOS PAISES

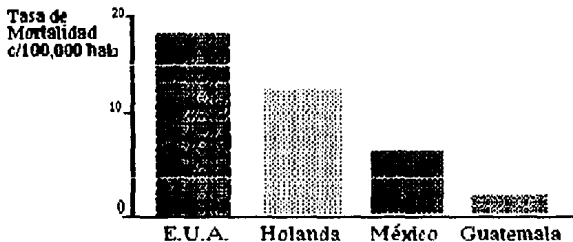


Figura 4 (Zubirán, 1960)

En México, como los datos son escasos, se estableció en 1980 un promedio entre el 2 y 5 % de la población, que representa un poco más de 2 millones de diabéticos conocidos. En otro reporte se estimó que en 1946 había una relación de 3.4 por cada 100,000 habitantes y en 1968 de 6.7. Estas cifras no pueden ser exactas pues en el registro de defunciones sólo el 60.3% de los certificados de defunción fueron expedidos por un médico, y en muchos casos no está consignada correctamente la causa de muerte por ignorar la causa principal de ésta. (12)

Se reportó en un estudio llevado a cabo durante cinco años en el Hospital General de México (11) que la Diabetes Mellitus representaba el 2.01% de los ingresos vistos por primera vez en consulta externa, siendo una de las primeras diez causas de enfermedad en el nosocomio. También se puede concluir que la enfermedad aumenta de acuerdo con la sobrepoblación y no directamente por la enfermedad misma. La frecuencia de padecimiento con respecto al sexo varía desde 3-1 a favor de la mujer, y llega hasta 1-1. Esto se explica porque:

- 1) La mujer esté disminuyendo algunos factores de riesgo como la multiparidad.
- 2) Que las condiciones ambientales de ambos sexos sean cada vez más semejantes.
- 3) Que el avance de la tecnología predisponga al hombre a una vida más sedentaria, aumentando su obesidad, o que simplemente los hombres acudan con mayor frecuencia a los hospitales dejando a un lado falsos temores injustificados.

En cuanto a la edad se considera que en la tercera, cuarta y quinta década de la vida es donde mas se presenta la enfermedad, quizá porque los factores de riesgo se encuentran durante esta época con mayor relevancia, como son: vida sedentaria, estres, vida gestante, tabaquismo y obesidad entre otros. Se establece en la referencia (17) y la (11) que la frecuencia en México en personas entre 40-49 años es de 1 por cada 20, entre los 50-59 años es de 1 por cada 10 y entre los de 60-69 es de 1 por cada 7, como se puede apreciar en la figura 5. Los perfiles de distribución de Diabetes Mellitus para países desarrollados son diferentes a los perfiles de países en vias de desarrollo.

## I.B La Insulina

### I.B.1 Características de la insulina :

La insulina es una hormona cuya principal función es regular el contenido de azúcar en la sangre. Es una molécula biológica que en su forma madura esta constituida por dos péptidos. Forma cristales blancos o prácticamente blancos los que son solubles en soluciones diluidas de ácidos y Alcalis. (18)

La insulina se conoce desde principios de siglo. En 1911 E.L.Scott extrajo un principio activo del páncreas y Mering y Minkowski en 1889 ya habian demostrado que los perros pancreatetectomizados mostraban un síndrome similar a la Diabetes Mellitus humana. Pero no es sino hasta 1921 que Banting y Best (21) extrajeron la insulina del páncreas y

## PREVALENCIA COMPARATIVA DE LA DIABETES EN DIVERSOS PAISES

### DISTRIBUCIÓN POR EDADES

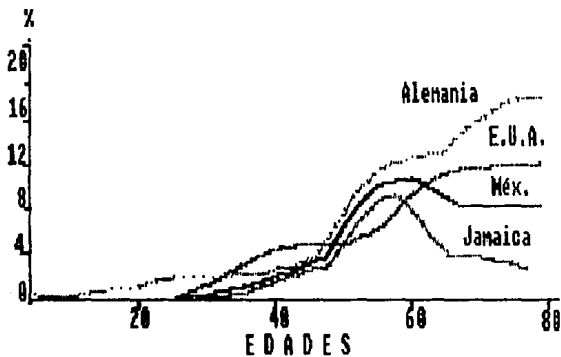


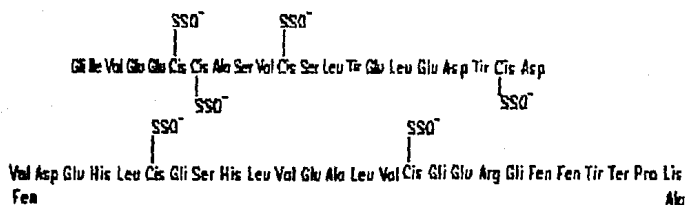
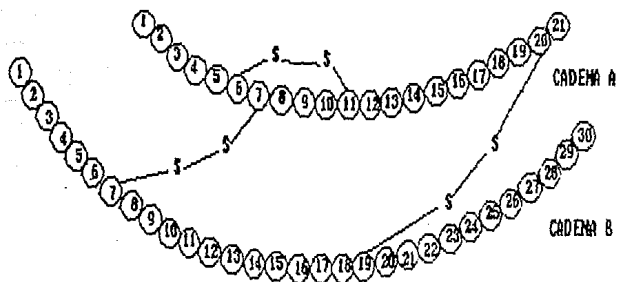
Figura 5 (Zubirán, 1960)

demonstraron sus efectos terapéuticos en perros y sujetos diabéticos. Banting dejó claro que es el tejido insular en el páncreas el que secreta la insulina.

En 1955 Sanger (3) dilucidó la estructura primaria de la insulina y en 1963 investigadores lograron la síntesis de dicha hormona, siendo así, el primer polipéptido al que se le determinó la estructura primaria. La insulina es una proteína formada por dos cadenas llamadas A y B respectivamente. La cadena A consta de veintiún aminoácidos y la cadena B de treinta aminoácidos. Están unidas por puentes disulfuro que conectan el aminoácido siete de la cadena A con el aminoácido siete de la cadena B (el A-20 con el B-19) y existe un puente disulfuro en la misma cadena A entre el seis y el once. Por rayos X se ha determinado la estructura secundaria y terciaria (22) y se ha determinado que la porción de la cadena A es la más expuesta, incluyendo el puente disulfuro. La cadena B se encuentra en la porción interna de la molécula (1). (ver figura 6).

Se considera a la molécula de la insulina como molécula de referencia entre lo que es un polipéptido y una proteína, su peso molecular es de 5900 daltons. La insulina puede existir como monómero, dímero o hexámero. La molécula hexamérica está compuesta de tres dímeros. Dos moléculas de zinc (2+) se coordinan en el hexámero que es presumiblemente la forma almacenada en los gránulos de la célula beta del tejido insular del páncreas. Se cree que la forma biológicamente activa de la hormona es el monómero. (2).

# Molécula de la Insulina



Cadena A y B, oxidadas para proteger grupos sulfuro

Figura 6



Se ha estudiado la diferencia aminoacídica de la molécula entre varias especies animales y se ha encontrado que es muy pequeña. Ambas secuencias de las cadenas A y B son muy similares entre mamíferos y aves, con la excepción de ciertos roedores. (4) Aún la insulina de los peces mantiene una homología mayor al 50 % comparada con la insulina existente en los mamíferos, lo cual cuenta para el alto nivel de la actividad biológica de la insulina de pescado cuando es inyectada en mamíferos. (4) La insulina de bovino difiere de la humana en tres aminoácidos: el 8 y el 10 de la cadena A y el 30 de la B. La insulina porcina sólo difiere en el aminoácido 30 de la cadena B, esto explica porque la sustitución de insulina animal se ha usado con tan buenos resultados, además de que la actividad biológica varía poco de una especie a otra.

En 1970 Steiner y otros, en la Universidad de Chicago, aislaron un precursor de la insulina al que denominaron proinsulina. Su peso molecular es de 9000 y tiene muy poca actividad biológica. En presencia de enzimas proteolíticas como la tripsina o carboxipeptidasa se rompe la proinsulina liberando el péptido de conexión (también llamado cadena C) y la insulina. A este rompimiento se le llama postraslación proteolítica de la insulina (1).

### I.B.2 Función biológica de la Insulina :

La insulina desempeña un papel importante en el organismo causando un aumento en el metabolismo de los carbohidratos, síntesis de ácidos grasos, captación de aminoácidos, síntesis de proteínas y almacenamiento de glucógeno. Es una hormona anabólica que actúa sobre una variedad de tejidos, incluyendo: hígado, tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético, y cristalino del ojo.

La insulina se une firmemente a un sitio receptor altamente específico en la membrana plasmática. La cantidad de insulina unida a la membrana esta en paralelo con su actividad biológica. Así mismo, la insulina puede ejecutar la mayor parte de sus funciones sin penetrar a la célula (2).

En síntesis, las principales funciones de la insulina son: 1) el facilitar el transporte de sustancias que incluyen a la glucosa, aminoácidos, calcio, potasio, y fosfato inorgánicos hacia el interior de la célula, destacando el aumento de la concentración de glucosa intracelular que le sirve a la célula como principal fuente de energía. 2) induce la síntesis de enzimas específicas para la glucólisis, efectuando así una disminución simultánea en la gluconeogénesis (2).

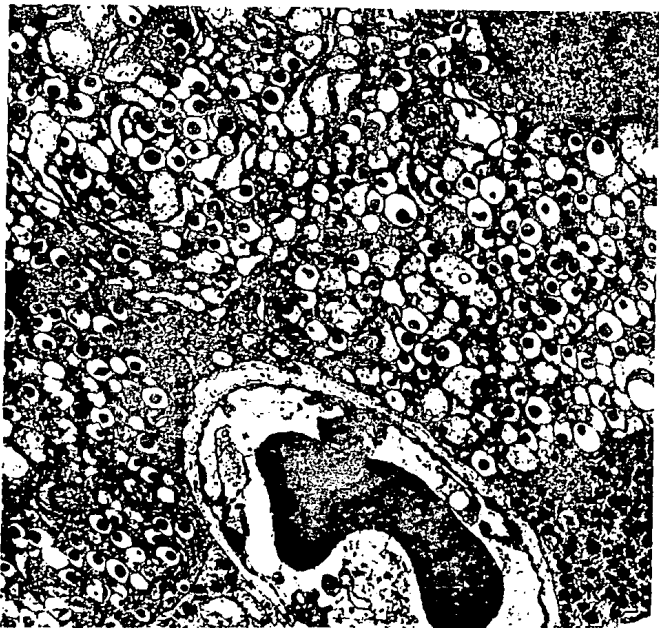
### I.B.3 Síntesis biológica de la Insulina :

La insulina se produce en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas endócrino. En la figura 7 se puede apreciar la distribución de las diferentes tipos de células en el tejido insular del páncreas.

El tejido insular se compone de 4 tipos de células y cada una de ellas sintetiza un polipéptido diferente: la insulina en las células beta, el glucagón en las células alfa, la somatostatina en las células D y el polipéptido pancreático en las células PP o F. Las células alfa representan el 25% del islote. Cuando se presenta la Diabetes Mellitus juvenil (insulinodependiente) existe una marcada reducción del volumen de las células beta (26), las células alfa, D y PP no se modifican. En la Diabetes no independiente de la insulina aumenta la masa de células alfa y no se observan alteraciones en el resto del tejido.

La insulina que se produce en los islotes de Langerhans proviene de la conversión de la proinsulina en insulina en el aparato de Golgi. El péptido C es retenido en el gránulo donde la proinsulina es sintetizada.

La insulina forma parte de un mecanismo de regulación de concentración de glucosa en la sangre. La glucosa es el estimulante fisiológico de la secreción de insulina; en la figura 8 se presenta el mecanismo de secreción de la misma. Las células beta poseen un receptor sensible a determinadas concentraciones de glucosa mediante el cual la secreción de insulina aumenta notablemente. Al relacionar concentración

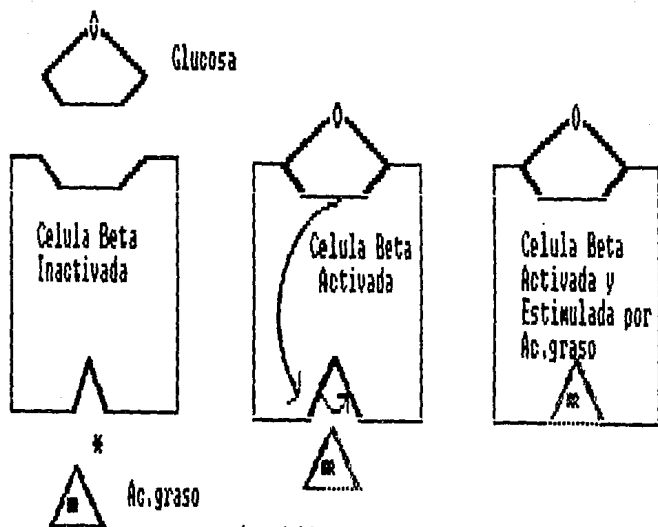


**ULTRAESTRUCTURA** de las células isletarias pancreáticas de rata. Se observan dos células *B*, cuyos gránulos secretorios muestran un contenido electrodensamente positivo, lo que facilita la unión de la membrana que los envuelve; esta característica nos permite diferenciar la

célula *B* de otras células isletarias (abajo, a la derecha). En la parte inferior de la microfotografía aparece un capilar fenestrado con un estrechamiento en su lumen. Esta microfotografía, de 15.000 aumentos, ha sido realizada en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Figura 7

Mecanismo de Secreción de la Insulina  
figura 8



\* Los ácidos grasos (tal como ac. palmítico, láurico y oléico) estimulan la secreción de insulina cuando la célula Beta está activada por glucosa.

de glucosa con la respuesta insulínica se obtiene una curva sigmoidea, es decir, la respuesta no es lineal, ésta respuesta demuestra que las células beta poseen alta sensibilidad a determinadas concentraciones de glucosa (2).

La respuesta insulínica tiene dos mecanismos frente a la glucosa; uno debido a las concentraciones crecientes de glucosa en el medio, que repercutirán en los niveles intracelulares, y el otro debido a un transportador de glucosa, llamado glucosensor, que provoca una respuesta más grande a la producción de insulina. Este efecto sólo se presenta en un rango determinado de concentración de glucosa. Cabría pensar que en la célula beta la glucosa se une a una proteína en varios puntos de unión de tal modo que la fijación de una primera molécula de glucosa favorecerá la unión de las siguientes, obteniéndose así la respuesta no lineal (2).

La glucosa tiene un papel permisivo para que otras sustancias estimulen la secreción de la insulina de las células beta y a la vez actúa como regulador de la secreción. Entre los estimuladores más potentes cabe destacar azúcares tales como manosa y glucosa, aunque una pequeña modificación en la estructura puede inhibir la secreción (por ejemplo glucosa 1-fosfato); en aminoácidos la capacidad varía según la especie, en el hombre, por ejemplo, el más potente es la Arginina (2); los lípidos tales como ácidos grasos estimulan la secreción; hormonas gastrointestinales como la pancreozimina estimula potentemente la secreción (esto

explica porqué la glucosa administrada por vía oral, la cual a su vez estimula la producción de la pancreozimina, activa doblemente la producción de insulina, no así por vía intravenosa.); y por último, las sulfonilureas que son los hipoglucemiantes alternativos a la insulina que más se utilizan en el tratamiento de la Diabetes .

#### I.B.4 Producción Industrial de la Insulina

La insulina se pudo aislar hasta 1921, gracias a Banting y Best, los cuales tardaron más de 20 años en lograrlo, debido a que al tratar de extraerla, ésta era hidrolizada por enzimas proteolíticas contenidas en el jugo pancreático. Se aisló atrofiando la actividad exócrina (jugo pancreático) del Páncreas. Un homogeneizado de este páncreas podía bajar la hiperglicemia en el perro diabético. (2)

La insulina se siguió utilizando y se obtenía principalmente del páncreas de ganado bovino, ovino y porcino, actualmente se obtiene también de esta forma. La mayor parte de las presentaciones comerciales contienen 2/3 partes de insulina bovina y 1/3 parte de porcina (5). El uso continuo de insulinas de origen animal, en algunas ocasiones, puede ser problemático, dada su potencialidad antigénica, ya que se producen anticuerpos anti-insulina que pueden llevar a una alergia local o sistemática, resistencia inmunológica a la insulina y lipoatrofia en los sitios de inyección. (25). Es por esto que la disponibilidad de insulina humana es deseable (5).

A corto y a mediano plazo el tratamiento más común para los diabéticos dependientes de la insulina será la administración externa de insulina. Actualmente se están usando, en contados casos, dispositivos electromecánicos implantables que suministran la dosis requerida de insulina automáticamente y, con más frecuencia, bombas desechables de administración rápida. Los trasplantes de tejidos de islotes de Langerhans todavía no se ha logrado en el hombre y la manipulación genética es todavía mucho más remota.

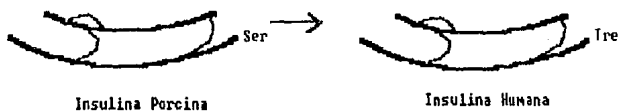
En la figura 9 se muestran las diferentes maneras de obtener insulina humana. La obtención de esta insulina puede realizarse por medio de cuatro métodos: extracción del páncreas de cadáveres humanos; síntesis química total; conversión de la insulina porcina; y por fermentación con microorganismos modificados con técnicas de ingeniería genética que producen precursores de la insulina. En los dos primeros casos se tienen serias restricciones: la poca disponibilidad de páncreas humanos y su bajo rendimiento, hacen que estas opciones no sean viables (5).

El tercer caso sería el de transformar insulina porcina a humana químicamente, cambiando el aminoácido 30 de la cadena B, de alanina a treonina. Este método ha sido desarrollado por Novo y actualmente se vende en Europa el producto. Sin embargo, éste está condenado a desaparecer debido a la baja disponibilidad en un futuro de materia prima animal y el fortalecimiento del mercado de la insulina humana.

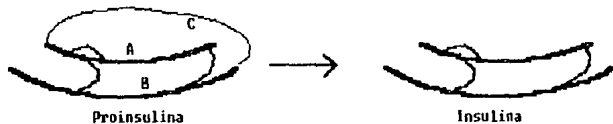


## OBTENCION DE INSULINA HUMANA

1. Páncreas humano
  2. Síntesis Química
  3. Transformación química de insulina porcina
- } No factibles



4. Ingeniería Genética
- a. Proinsulina



- b. Cadenas A y B (por separado)

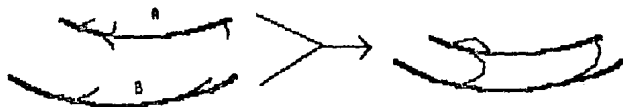


Figura 9

Por último, existen actualmente dos métodos para producir insulina humana por medio de técnicas de ingeniería genética. El primero es producir la proinsulina en levaduras y luego procesar la proinsulina en insulina. El segundo es producir en bacterias las cadenas A y B, por separado, purificarlas y posteriormente unir las para formar la insulina.

La ingeniería genética permite el aislamiento o síntesis de genes humano y su expresión en microorganismos. De esta manera las compañías Genentech y Eli-Lilly han logrado la producción de insulina humana por bacterias, que hoy se vende en varios países con el nombre de Humulin.

#### I.C. Producción de Insulina Humana por medio de Ingeniería Genética.

##### I.C.1 Esquema General.

En 1982 fué cuando por primera vez en el mundo se produce a nivel industrial insulina humana por medio de técnicas de ingeniería genética. Pero desde 1977 Ullrich (27) y en 1978 Villa-Komaroff (28) prepararon clones bacterianas que sintetizaban proinsulina. Todos ellos siguieron el siguiente esquema:

- a) Obtención del DNA específico, b) clonación de un vehículo molecular que permita su biosíntesis y estabilidad.
- c) Producción bacteriana de los polipeptidos híbridos,
- d) aislamiento de proteínas híbridas, e) purificación de las proteínas híbridas, f) separación de los intermediarios de

la proteína fusionada, y g) transformación de los intermediarios para obtener insulina humana biológicamente activa.

#### I.C.2 Descripción de la tecnología CIIGB-UNAM:

En 1981 el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM inicia un proyecto de investigación con el objetivo de obtener insulina humana, utilizando técnicas de DNA recombinante en donde se decidió utilizar el método de cadenas separadas. En este proyecto de 1981-1988 se han invertido aproximadamente 93000 horas-hombre, trabajando en él un grupo de 15 personas, siendo responsable del proyecto el Dr. Francisco Bolívar.

Se ha realizado hasta 1988 : a) una síntesis química de los genes que codifican para las cadenas A y B de la insulina humana. b) Ensamble y clonación molecular de estos genes. c) Construcción de dos plásmidos recombinantes con genes híbridos que codifican para proteínas híbridas en los cuales los extremos de estas cadenas los constituyen las cadenas A y B respectivamente. d) Obtención de biomasas inducibles y producción de proteínas híbridas. e) Purificación de proteínas híbridas por centrifugación diferencial f) Separación de cadenas A y B de la proteína híbrida con Bromuro de cianógeno y subsecuente purificación de las cadenas por separado por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). g) Asociación de cadenas A y B, para producir insulina hasta con un 60% de eficiencia, y

purificación de la misma por HPLC. h) Caracterización de la insulina producida mediante pruebas fisicoquímicas y biológicas.

#### I.C.2.a Síntesis química de los genes que codifican para las cadenas A y B.

Para sintetizar químicamente los genes, conociendo las secuencias de aminoácidos de las cadenas A y B de la insulina, se diseñaron dos fragmentos de DNA que contienen la información para codificar las cadenas. Existe un gran número de combinaciones posibles que codifican para estas cadenas. Para seleccionar los tripletes más adecuados se escogieron aquellos codones utilizados preferentemente por el genoma de E.Coli. La secuencia se construyó a partir de una serie de fragmentos traslapados para evitar apareamientos inespecíficos inter e intramoleculares. Se evitaron secuencias ricas en timina, guanina y citosina, ya que este tipo de secuencias están involucradas en la terminación de la transcripción, ver figura 10.

Para la cadena A se sintetizaron 12 oligonucleótidos de varios tamaños (uniéndose covalentemente por complementariedad) para formar la doble hélice de DNA que codifica para cadena A, utilizando ligas de DNA para establecer las uniones fosfodiéster. El gen sintético para cadena A tiene en uno de los extremos de los nucleótidos 5'AATT (hélice sencilla) y en el otro CTAG5'. Estos son los extremos cohesivos que se obtienen de la digestión de fragmentos de DNA con las endonucleasas EcoRI y BamHI, que

GENES SIMTETICOS PARA CODIFICAR CADENA A Y CADENA B

GENE CADENA A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21  
 MET GLI ILE VAL GLU GIN CIS CIS TRE SER ILE CIS SER LEU TIR GIN LEU GLU ASN TIR CIS ASN

EcoRI

AAATTCATGGGCATCGTTGAACAGTGTGGCACTTCATCTGCTCTCTTACCAGCTTGAGAACTACTTGTAACTAATAG

BamHI

GTACCCGTAGCAACTTGTACACAGTGGAGATAGACGAGAGAAATGGTCGAACTCTTGATGACATTTGATTATCTTAG

GENE CADENA B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30  
 MET PHE VAL ASN GIN HIS LEU CIS GLI SER HIS LEU VAL GLU ALA LEU TIR LEU VAL TIR GLI GLU ARG GLI PHE PHE TIR TRE PRO LIS TRE

EcoRI

AAATTCATGTTCTGCAATCAGACCCCTTTGTGTTCTCACCCTCGTTGAGCTTTGTACCTTGTGTCGTTGAACTGAGCTGTTTCTCTACACTCTAGAGACTTAATAG

BamHI

GTACAGAGCTTGTAGTCTGGAAACACCAGAGTGGAGCACTTCGAAACATGGAGACAAAACGCCACTTGCACCAAGAGATGTGAGGATTCGAAATTATCTTAG

Figura 10 (CIIBB, ref(9))

permiten el gen al vehículo molecular, previamente diferido con estas dos enzimas. En la parte final aparecen dos codones de terminación para detener la traducción del mensaje en ese punto. También se incluyó el codón ATG que codifica para metionina, lo que permitirá liberar a la cadena de la proteína híbrida.

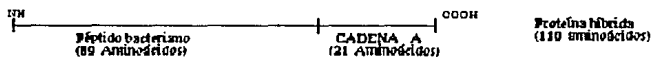
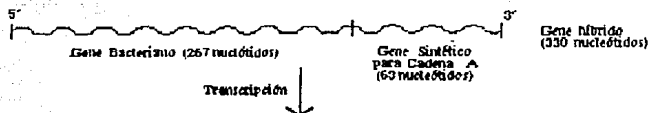
Para la cadena B se sintetizaron 18 fragmentos que tienen las mismas propiedades antes descritas aunque codifican para secuencias diferentes. Además el gen para B tiene un sitio de restricción para la endonucleasa Hind III.

#### I.C.2.b. Clonación molecular de los genes que codifican para A y B.

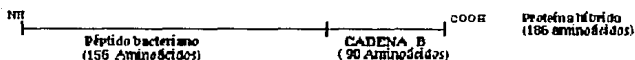
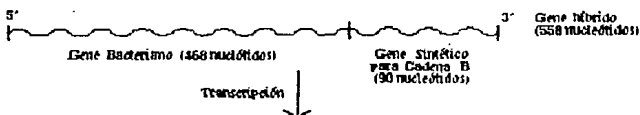
Estos genes son fácilmente clonables en el vehículo molecular pBR322, que tiene dos sitios de restricción única para las enzimas EcoRI y BamHI. El plásmido se corta con ambas enzimas y se generan extremos cohesivos y complementarios a los extremos de los genes sintéticos. Al sustituir la región de DNA entre EcoRI y BamHI por las secuencias para cada cadena se inactiva el gene que confiere resistencia a la tetraciclina, lo cual es útil. Se puede hacer una fácil selección de los plásmidos por su fenotipo ampicilina resistente y tetraciclina sensible. En la figura 11 se presenta un esquema de este procedimiento.

Las secuencias clonadas de esta manera carecen de un promotor adecuado (región de DNA reconocido por la polimerasa de DNA para comenzar la transcripción) por lo que

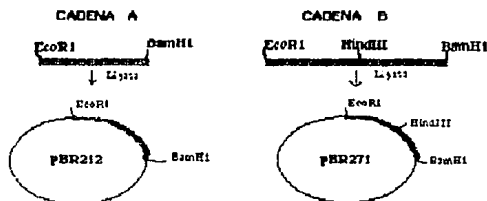
**GENE HÍBRIDO PARA CADENA A**



**GENE HÍBRIDO PARA CADENA B**

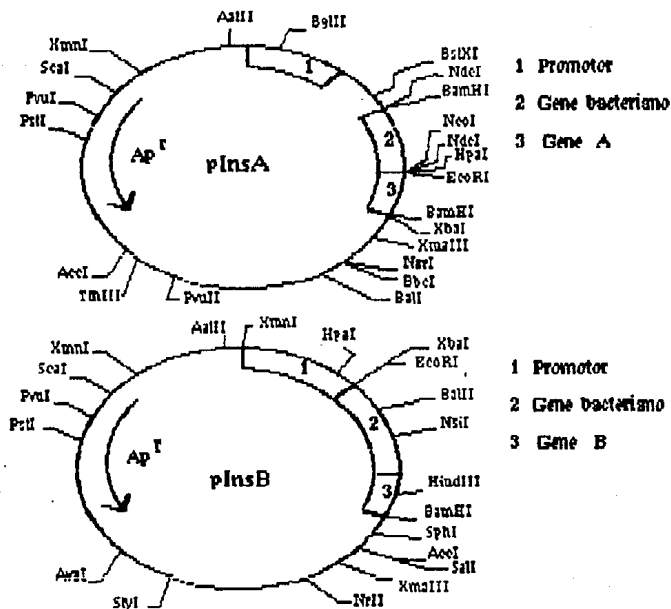


**Figura 13**



**Figura 11**

**SITIOS DE RESTRICCIÓN PARA LOS PLASMIDOS  
DE CADENA A Y CADENA B**



**Figura 12**



fué necesario colocar un promotor de E.Coli, del operón de triptófano, en la región 5' inmediatamente antes de los genes híbridos. Es por esto que, posteriormente, una vez alcanzada una biomasa aceptable, se tiene que inducir con triptófano la producción de la proteína híbrida.

En la figura 12 se pueden ver los diferentes sitios de restricción para los plásmidos utilizados para cada cadena, en ellos se pueden observar tres regiones importantes, el gene promotor de la inducción, y los genes que codifican para formar la proteína que acompañará a la cadena y la cadena misma.

El tamaño de la proteína puede ser importante, puesto que las proteínas muy pequeñas parecen ser fácilmente degradadas por E.Coli. Por esto, se recurrió a la fusión de genes, fusionando las cadenas de una proteína bacteriana de tal modo que no sea extraña a la bacteria y no sea degradada.

La cadena A se sintetiza en un precursor proteico de 101 aminoácidos de los cuales los primeros 80 son parte de la proteína bacteriana y los últimos 21 constituyen la cadena A. La cadena B se sintetiza de un precursor proteico de 186 aminoácidos, 156 son proteína bacteriana y los últimos 30 son parte de la cadena B. En la figura 13 se puede apreciar la síntesis de la proteína híbrida.

I.C.2.c Obtención de la Insulina a partir de los microorganismos modificados.

Para obtener la insulina se producen las cadenas por separado, se purifican y luego se unen, como se puede apreciar en la figura 14.

Las células que contienen ya la información genética para sintetizar cadena A y cadena B son crecidas en un fermentador. Bajo condiciones específicas se puede llegar a tener una concentración de biomasa de 20 g/l. El crecimiento de estas células debe de hacerse con todos los cuidados necesarios para evitar cualquier tipo de contaminación. Las cadenas se empiezan a formar dentro de la célula después de que se induce la formación de éstas por medio de calor para cadena A, y por medio de una concentración específica de triptófano para cadena B. Es decir, cuando se alcanza la concentración adecuada de células se induce la producción de cadena A o B dentro de la célula.

Después de inducir la formación de cadenas acumuladas en cuerpos de inclusión dentro de la célula se rompen mediante un sonicador, con el objeto de recuperar la proteína híbrida. Este resultó ser el método más efectivo para estos microorganismos. Enseguida se separa la biomasa de la proteína híbrida mediante centrifugación diferencial.

Posteriormente, se rompe la proteína híbrida para obtener las cadenas A o B; este rompimiento se logra mediante la cianogenólisis, un procedimiento que utiliza bromuro de cianógeno para romper un polipéptido en un aminoácido específico (Metionina). Para llevar a cabo esto se disuelve la proteína en ácido fórmico y después se agrega

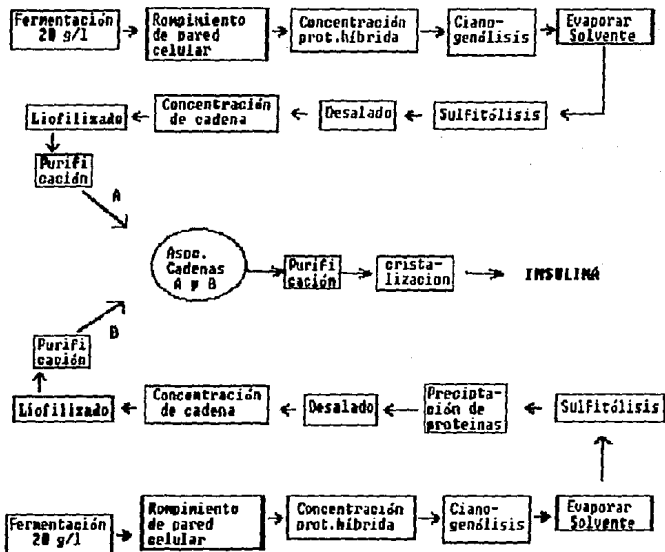


Diagrama de bloques de la tecnología desarrollada en el CIIGB (nivel laboratorio)  
Figura 14

el bromuro de cianógeno y se agita durante un periodo de 20 horas. Al terminar se evapora el ácido fórmico y se disuelve la mezcla de proteínas en una solución de cloruro de guanidinio y Tris; ya disueltos se lleva a cabo la sulfitólisis, cuyo propósito es el proteger los grupos sulfonados oxidándolos. Esto se logra agregando sulfito y tetratiónato de sodio en un pH neutro. Este paso es fundamental para lograr la asociación de las cadenas.

Los derivados sulfonados son llevados a procesos de purificación. El primer paso es el eliminar las sales mediante un proceso de diálisis, después se lleva a cabo una centrifugación para eliminar las cadenas más grandes y, con un secado previo (liofilizado), los derivados son llevados a un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) lográndose así una purificación de ambas cadenas con alta eficiencia. Por último, la asociación de ambas cadenas se logra al mezclar los derivados sulfonados en una proporción de 2 A por 1 B; una vez mezclados se reducen los grupos sulfonados para que se lleve a cabo la asociación. Es necesario incubar la mezcla de reacción bajo ciertas condiciones fisicoquímicas. La insulina correctamente asociada es purificada nuevamente por medio del sistema HPLC y cristalizada con zinc. De esta manera la insulina puede ser utilizada en el paciente diabético.

## I.D Bibliografía:

- (1) Martin, D.W., et al. Bioquímica de Harper 7a. ed. México, El manual moderno, 1984.
- (2) Goberna, R. "Como se segrega la insulina" Investigación y Ciencia, Num. 21, Junio 1978, pp.92-103
- (3) Sanger, F. y E. Thompson. "The amino acid sequence in the glycol chain of insulin", Biochemical Journal, Vol 53., Num 3, pp.353-374. (1953)
- (4) Permutt, A. y J. Chirgwin. "Insulin biosynthesis and Diabetes Mellitus.", Clinical Biochemistry Vol 14, Num.5, pp.230-236. (1981)
- (5) Galindo, E. "Desarrollo de metodologías que permitan el escalamiento a nivel de planta piloto de la obtención y aislamiento de intermediarios para la producción de insulina humana." Tesis de maestría en investigación biomédica básica, IIB-UNAM, 1983.
- (6) Mecklenburg, R. S., et al. "Long-term metabolic control with insulin pump therapy". New England Journal of Medicine, Vol.313, Num.8, (Agosto 1985)
- (7) Lehninger, A.L., Biochemistry, 2a.ed., Nueva York, Worth Publishers., 1975.
- (8) Tecnología para la producción de insulina humana por ingeniería genética, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Septiembre 1988.
- (9) Informe sobre el estado del proyecto Insulina, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Agosto 1988.
- (10) Keen, H. y R.J. Jarrat. "Environmental factors and genetic interactions", en Creutzfeldt N. et al. The genetics of Diabetes Mellitus, Berlin, Springer-Verlag, 1976.
- (11) Fanghanel, F. et al., "Epidemiología de la Diabetes Mellitus en el Hospital General de México de la S.S.A.", Revista Médica del Hospital General, (México) 39:77, 1985.
- (12) Zubirán, S., Cervantes, A. y R. Rodríguez, "La Diabetes Mellitus como problema de salud pública", Revista Investigación Clínica (México), 13:311, 1961.

- (13) Zubirán, S. y A.Chavez. "Estudio epidemiológico de Diabetes Mellitus en la Ciudad de México." Revista Investigación Clínica (México), 16:367, 1964.
- (14) Gordon, E.S. "Diabetes Mellitus; desarrollos recientes" Medicina de Posgrado (México), Febrero 1976.
- (15) Malaisse, W.J. "Actualité sur l'insuline", Annales d'endocrinologie (Paris), 1981.
- (16) Keefer, L.M. et.al. "Human insulin prepared by recombinant DNA techniques and native human insulin interact identically with insulin receptors" Proceedings of the National Academy of Science (EUA). 3:78:1391, 1981.
- (17) Lozano, C.O. "Simposio sobre Diabetes Mellitus." Medicina de Posgrado (México), 4:11, 1976.
- (18) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a.ed. México, Secretaría de Salud, 1989.
- (19) Balbás, P. y F. Bolívar Zapata Ingeniería Genética y Biotecnología, Washington, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1989. (Monografía 34, Serie Biología, OEA)
- (20) Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica, 7a.ed., México, Editorial Panamericana, 1988.
- (21) Banting, F.G., Best C.H. et.al. "Pancreatic extracts in treatment of Diabetes Mellitus". Canadian Medical Association Journal. 12:141, 1922.
- (22) Hodgkin, D.C. y D. Mercola "The secondary and tertiary structure of insulin in endocrine pancreas" p139, Vol 1, Secc.7, Handbook of Physiology, Washington D.C., American Physiological Society, 1972.
- (23) Sanger, F. "Chemistry of insulin.", British Medical Bulletin, Vol 16, pp.183-188 (1960).
- (24) "Symposium on human insulin of recombinant DNA origin" Skyler, J.S. (editor), Diabetes Care, Vol 5 (Sup.2), pp.1-186. (1982),
- (25) "Human insulin of recombinant DNA origin; clinical potential", Diabetes Skyler, J.S. (editor), Diabetes Care, Vol 5 (Sup.2), pp.1-186. (1982),

- (26) Steffan, Y. et.al. "Quantitation of endocrins cell content in the Pancreas of nondiabetics and diabetics humans" Diabetes, 31:694, 1982.
- (27) Ullrich, A. et.al. "Rat insulin genes: construction of Plasmids containing the coding sequence" Science, 196:1313, 1977.
- (28) Villa-Komaroff, L. et.al. "A bacterial clone synthetizing proinsulin" Proceedings of the National Academy of Science (EUA). 75:3727, 1978.

CAPITULO II  
ESTUDIO DE MERCADO

II.A La Insulina como producto comercial.

II.A.1 Tipos de Insulina comercial y sus usos.

La producción de Insulina ha tenido un gran desarrollo comercial. Estos progresos han resultado en la comercialización de insulinas de diferentes especies, como son la porcina, la bovina y la humana. También se comercializan insulinas de muy alta pureza (17) y (20).

A consecuencia de una recomendación del comité de la Asociación Americana de Diabetes para uso de agentes terapéuticos, las insulinas U-40 y U-80 (40 y 80 unidades por mililitro respectivamente) se han estado eliminando a favor de una sola forma de dosis U-100 para todos los tipos de insulina.(3) El objetivo es reducir la posibilidad de error, el cual es mayor con las dosis múltiples y con jeringas de doble calibrado, que con una sola forma de dosis. Preparados concentrados de insulina de 500 unidades por ml (U-500) son utilizados en pacientes con resistencia a la hormona. La cuenta total bacteriana no debe exceder de 100 por g, y la concentración de proinsulina no debe de ser mayor a 10 ppm.(14)

A principios de la década de los setenta las formas comerciales de la insulina contenían cantidades significativas de proinsulina, así como sus productos de conversión incompleta, lo cual significaba un riesgo



potencial de antigenicidad. Actualmente, se han logrado procesos de purificación para la hormona con el fin de lograr preparados "de un solo pico o máximo", cromatográficamente hablando, e insulina "monocomponente". Se ha logrado vender insulina con un 99% de pureza, conteniendo no más de 10 ppm de proinsulina. La insulina de origen porcino "purificada" es la de menor riesgo inmunogénico de las no humanas y según la compañía Novo (1) se puede considerar como "no alérgica" debido a que la diferencia aminoácídica es muy pequeña. Las impurezas serían la única causa de una posible reacción alérgica. Los riesgos de escasez de este tipo de insulina son menores que para la insulina la bovina (1). Los problemas que se tienen en la purificación del producto, aparte de su alto costo, son las grandes pérdidas de la hormona (según Novo en la porcina un 10 % ). Para la compañía Eli-Lilly se puede llegar a tener una escasez debido a las grandes pérdidas que se tienen en la purificación de la hormona, mientras que para el Departamento de Salud de los EU no existen bases para decir que habrá escasez (1). Se ha recomendado el utilizar insulina porcina o humana en los nuevos pacientes aunque no existen bases para elegir entre estas dos.

Actualmente la insulina se envasa en un buffer con pH neutro ,mejorando así, la estabilidad del producto aunque todavía es necesario conservar el producto en lugares con poca luz y a una temperatura moderada. La ventaja de tener un mismo pH en las diferentes marcas y tipos del producto es

el poder mezclarlos para lograr una proporción adecuada en un tratamiento específico.

En el mercado se consumen tres categorías de insulina según su rapidez de acción. Los tres tipos son : acción rápida, acción intermedia y acción prolongada o lenta.

La insulina de acción rápida se prepara al precipitar la hormona en presencia de cloruro de zinc en un buffer aceptable. Es el único tipo de insulina que puede ser administrado en forma intravenosa, intramuscular o subcutánea. Después de su administración se absorbe rápidamente y su tiempo de acción es relativamente corto. Esta preparación es adecuada para una diabetes inestable y en complicaciones de ésta, tales como: un shock o un coma diabético, durante una cirugía o un parto o para controlar una cetoacidosis (3).

La insulina de acción intermedia se logró al preparar un complejo proteico con la insulina, el zinc y una proteína de alto peso molecular, como lo es la protamina (16). La absorción disminuye debido a que este conjugado tiene una reducida solubilidad isoeléctrica. Esta solución es también llamada insulina isófana NPH (la N denota una solución neutra (pH 7.2), la P se refiere al contenido de insulina protamina zinc, y la H significa el origen del complejo del laboratorio de Hagedorn). La administración de este tipo se efectúa únicamente de manera subcutánea, nunca debe ser en forma intravenosa. Puede ser utilizada para todos las formas

de diabetes excepto en tratamientos iniciales, en cetoacidosis diabética o en emergencias.

La insulina de acción prolongada contiene mucho más protamina y zinc que la insulina isófana; se considera como una suspensión de insulina-zinc-protamina. La reducida solubilidad de este complejo, así como su alta estabilidad, logran hacer que el tiempo de absorción sea muy largo. La larga duración de acción algunas veces provoca una hipoglicemia si la dosis no fué correctamente administrada y debido al retardado efecto. La protamina libre puede formar un complejo con la protrombina y provocar un linfedema alrededor del sitio de inyección. Esta preparación es útil para controlar hiperglicemias en diabetes suaves o moderadas y no puede ser utilizada en el caso de emergencias. Su administración debe de ser únicamente subcutánea.

Investigaciones realizadas han revelado que la solubilidad de la insulina está en función de su estado físico (amorfo, cristalino, y el tamaño de los cristales), por su contenido de zinc así como del buffer donde se encuentra. Es debido a lo anterior que la insulina puede prepararse en una forma de absorción sin el uso de grandes proteínas.

En la tabla siguiente se muestran algunas características importantes de las tres categorías de la insulina.

Preparado	Apariencia	Modifi- cador proteico	Tiempo inicia- ción (horas)	Dura- ción acción (horas)
Insulina rápida	soln.clara	Ninguno	1	14
Insulina isófana	susp.turbia	Protamina	2	24
Insulina prolongada	susp.turbia	Protamina	4	36

Es común el utilizar algunas combinaciones de estas formas para lograr una proporción adecuada para un tipo de tratamiento. En México se distinguen estos tres tipos y aparecen publicados en la modificación al Cuadro Básico de Medicamentos publicada en el Diario Oficial (10), ahí se indican los nombres de las insulinas así como sus presentaciones.

La producción de insulina humana comienza con dos logros importantes en 1977: la clonación de un gen de insulina de rata en un plásmido por Ullrich et. al. (21), y la expresión de genes sintetizados químicamente de la hormona somatostatina por Itakura et. al. (18). Es a raíz de esto que en 1978 Villa-Komaroff et.al.(22) logran clonas bacterianas que sintetizan proinsulina de rata, y Crea et.al. (14) sintetizan químicamente los genes que codifican para las cadenas A y B de insulina humana. Finalmente, se

logra la expresión de genes que sintetizan para cadenas de insulina humana en E.Coli (15) en 1979. En junio de ese mismo año Lilly es autorizada para escalar el proceso hasta 150 litros y en 1980 se publica la primera experiencia clínica con esta insulina (19). En mayo de 1982 se solicita la aprobación de la FDA y para octubre se les concede (4). A finales de 1982 se comienza la construcción de 2 plantas una en Indianápolis (EUA) y otra en Liverpool (GB). Para 1983 Lilly producía insulina humana en fermentadores de 10,000 galones habiendo invertido en el proyecto casi 100 millones de dólares (4). En México se logró la síntesis química de los genes siguiendo las estrategias de Goedell y Crea. (15) y (14)

La insulina de Lilly no presenta proinsulina como impureza debido a la forma de producirla, además de no presentar ningún tipo de problema inmunológico en su uso. Se reporta también la ventaja de tener que utilizar menores dosis que en el caso de las insulinas animales.

#### II.A.2 Alternativas al uso de insulina; sustituyentes.

La mayoría de los diabéticos son obesos y tienden a tener elevados niveles de insulina endógena. No existe una respuesta adecuada entre los niveles de insulina y la concentración de receptores de insulina en los tejidos, esta respuesta esta correlacionada con la concentración de estos receptores. El tratamiento seleccionado en estos pacientes es una restricción en la dieta y una reducción del peso, lo

cual incrementa la sensibilidad a la insulinas, así como el uso de cualquier agente hipoglucemiante que tenga la capacidad de estimular la secreción de insulina.

En 1942 Janbon y colaboradores descubrieron que una sulfonamida (p-amino-benceno-sulfonamido-isopropiltiadiazol) inducía hipoglicemia. Lou Batières descubrió que el compuesto no tenía efecto en un animal pancreatetectomizado y sugirió que era resultado de la estimulación del páncreas de secretar insulina. Poco después se introdujo la tolbutamida.

Las sulfonilureas activan el tejido insular para secretar insulina. Estudios clínicos demuestran que las sulfonilureas son ineficaces en pacientes pancreatetectomizados y en sujetos diabéticos insulino dependientes. En cambio, son efectivas en pacientes insulino independientes en los que el páncreas conserva la capacidad de secretar insulina.

Las sulfonilureas no deben usarse en enfermos con insuficiencia hepática o renal debido al importante papel del hígado en su metabolismo y del riñón en la excreción de las drogas y sus metabolitos. Provocan intolerancia al alcohol, palpitaciones y náuseas. Están contraindicadas en las circunstancias siguientes: diabetes insulino dependiente, diabetes gestacional, embarazo, cetosis, cetoacidosis y coma hiperosmolar, cirugía mayor, parto y padecimientos no metabólicos intercurrentes (5).

Las principales sulfonilureas son la tolbutamida, la acetohexamida, la tolazamida y la cloropropamida. En México se utilizan con mayor frecuencia tolbutamida, cloropropamida y glibenclamida (5).

Las biguanidas son otro tipo de medicamentos empleados como hipoglucemiante; su forma de acción es muy similar al de las sulfonilureas. De la familia de compuestos de las biguanidas se utilizan principalmente el fenformin. Está indicado para pacientes insulino independientes con hiperglucemia moderada y exceso de peso. Sus contraindicaciones clínicas son las anotadas para las sulfonilureas y edad mayor de setenta años (5).

Cuando se tiene un descontrol en la enfermedad con biguanidas o con sulfonilureas se puede administrar una combinación de ambas, las que con mayor frecuencia se emplean son: cloropropamida-metformin, cloropropamida-fenformin y glibenclamida-fenformin.

Los hipoglucemiantes se administran cuando no se puede controlar con dieta a pacientes insulino independientes. Primero se prueba con sulfonilureas y luego con biguanidas o una mezcla de ambas. Si esto no funciona se tendría que controlar directamente con insulina. En Estados Unidos el uso de biguanidas es controlado y están disponibles bajo ciertas condiciones especiales. Por ello el consumo de insulina, en proporción, es mayor que en México (25).

Los hipoglucemiantes como las sulfonilureas y las biguanidas son sustituyentes del producto insulina en el caso de los pacientes insulino independientes. Sin embargo, casi no pueden considerarse como tales ya que cada medicamento es usado en casos muy particulares: en el caso de insulino dependientes no son sustituyentes. Los injertos de páncreas como tratamiento alternativo al problema de la diabetes y el uso de moléculas con estructura similar a la insulina reconocibles por los glucoreceptores no han probado ser útiles. El empleo de la insulina está lejos de ser sustituido.

## II.B Los productores de Insulina.

### II.B.1 Productores y distribuidores.

Existen varios productores de insulina a nivel mundial, estas son las grandes compañías farmacéuticas y las nuevas compañías de productos biotecnológicos de alto valor agregado. Estas operan en Estados Unidos y en Europa. Las formas de producción varían bastante para cada empresa, en especial este el caso de la insulina.

Eli-Lilly produce insulina bovina, porcina y humana, distribuyendo sus productos en todo el mundo. La bovina y la porcina se venden principalmente en países en vías de desarrollo. La insulina humana, por su elevado precio, sólo puede ser consumida Estados Unidos y Europa.



Novo, una compañía danesa, ha logrado acaparar una parte importante del mercado en Europa donde antes Lilly lo dominaba. Novo comenzó a introducir insulina porcina "monocomponente" en respuesta anticipada a la insulina humana de Lilly alegando que la respuesta inmunogénica a la insulina porcina no era debido a la estructura de ésta, sino a la cantidad de proinsulina presente (1). Posteriormente, introdujo la insulina humana obtenida por la conversión química de la porcina. Al parecer Novo no está interesado en el mercado latinoamericano.

Existen otros muchos productores menores de insulinas animales que venden sus productos en mercados locales como es el caso de productores argentinos (23). También existen productores intermedios como los laboratorios Squibb que venden su insulina en Estados Unidos. La producción de insulinas animales presenta muchos problemas porque se requieren de muchos páncreas en buen estado para poder extraer suficiente cantidad de la hormona. Las vísceras, casi en su totalidad, son consumidas como alimento en México. Los órganos obtenidos en los rastros se encuentran en mal estado y por el maltrato rinden menor cantidad de insulina o en muchos casos no se pueden utilizar.

Al mismo tiempo, grandes compañías químicas se están introduciendo al mercado de productos fabricados por Ingeniería Genética, obligadas por la creciente competencia de recientes compañías en este mercado estratégico. Höchst

acaba de terminar las pruebas clínicas necesarias para introducir su nuevo tipo de insulina humana (24).

En el caso de México no existen productores. La única compañía que vende sus productos es Eli-Lilly. Ella importa la insulina en su totalidad y la envasa en México. En la actualidad únicamente se distribuyen las insulinas bovina y porcina.

## II.B.2 Importación y exportación.

De acuerdo a datos del Banco de Comercio Exterior no existe ninguna exportación por parte de México. En el caso de las importaciones esta registrada sólo la compañía Eli-Lilly, la cual lo importa de Estados Unidos, Argentina y Brasil. Los valores encontrados para la importación (ver figura 1) no concuerdan con el valor de 8 a 11 millones de dólares al año estimado en la referencia 9 del capítulo I (también ver sección 4, capítulo II), esto es debido a que Lilly trae la insulina a granel y la envasa aquí vendiéndola después a precios más altos.

## II.B.3 Precios.

Los precios actuales (Marzo, 1989) de las diferentes insulinas en México obtenidos directamente en establecimientos comerciales (frasco de 1000 U.I.) son:

Insulina rápida R	\$21,048.00 M.N.
Insulina intermedia NPH	\$20,566.00 M.N.
Insulina prolongada PZI	\$20,961.00 M.N.

La Secretaría de Comercio y Fomento Industrial autoriza como precio máximo para negociación en los concursos de adquisición del Cuadro Básico de Medicamentos para el Sector Salud en 1989:

Insulina rápida R	\$12,416.00 M.N.
Insulina intermedia NPH	\$12,204.00 M.N.
Insulina prolongada PZI	\$12,309.00 M.N.

En las figuras 2,3,y 4 se presentan datos históricos de precios para las diferentes tipos de insulina. Estos datos

# Importación de Insulina a México (Bancomext, frac.aranc. 29-39A-006)

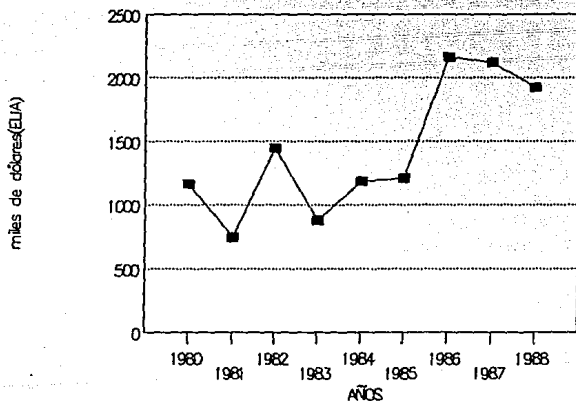


Figura 1

## Precios insulina bovina (87-88)

SECOFI

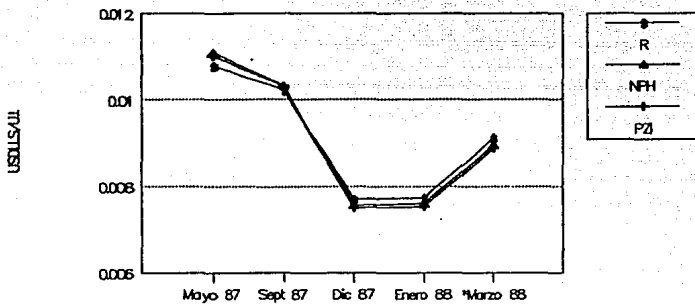


Figura 2

## Precios insulina porcina (86-88)

SECOFI

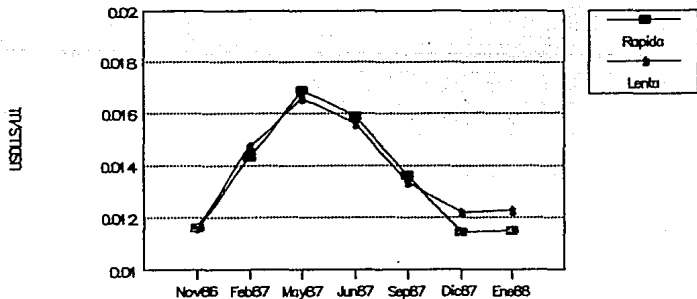


Figura 3

# Precio demandado por la SSA concurso (86-88)

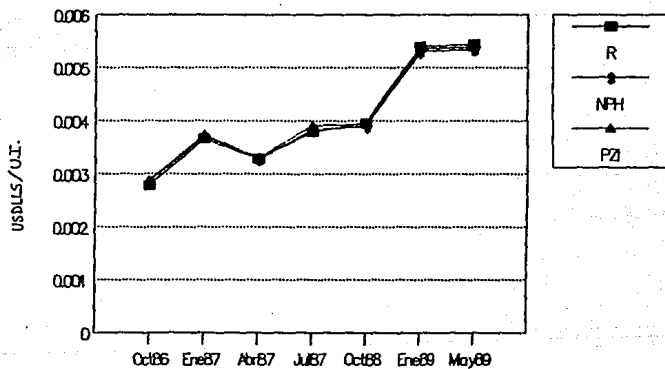


Figura 4

fueron obtenidos en SECOFI. Se puede notar la marcada influencia del control de precios del gobierno.

## II.C Consumo de insulina en México.

### II.C.1 Los consumidores.

Dentro del programa nacional de Diabetes se menciona que el 60 % de los diabéticos requieren de medicamentos, el resto puede ser controlado con ejercicio y dieta. De éstos únicamente el 10 % deben de ser tratados con insulina, el resto puede ser controlado con hipoglucemiantes orales.

El consumo de insulina se divide para distintos usos: en el caso de pacientes insulino dependientes, donde se emplea diariamente, el consumo representa un 1% del consumo total de insulina en nuestro país. Los diabéticos de este tipo deben de consumir aproximadamente entre 20 y 50 UI/día (23) y (25) aunque esto varía con el desarrollo de la enfermedad. El resto del uso de la insulina, es decir el 9 % está destinado a la diabetes estable que es tratada con hipoglucemiantes orales, pero en ocasiones es necesario suministrar dosis de insulina por un descontrol en la enfermedad, por emergencias en hospitales, por cirugías y por partos.

De acuerdo a la clasificación de tipos de insulinas la insulina de acción intermedia (insulina isofánica NPH) es la de mayor demanda con un 85 % en comparación con los otros dos tipos de insulina, la de acción rápida ocupa el segundo lugar con una demanda de un 11 %, siendo la insulina de acción prolongada la de menor demanda en nuestro país (4 %).

En México el consumo de la hormona se da de dos maneras: uno es el consumo del sector público (Secretaría de Salud) y el otro es por medio de establecimientos privados. El sistema de salud está constituido por diferentes instituciones incorporadas a él: el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Instituto de Seguridad Social y Servicio para los Trabajadores del Estado (ISSSTE), los hospitales de PEMEX y una serie de hospitales que dependen directamente de la SSA, así como la clínica de Diabetes del Instituto Nacional de la Nutrición.

La SSA se encarga de recopilar la demanda de cada dependencia del sector de acuerdo al Cuadro Básico de Medicamentos. También se responsabiliza de efectuar concursos de adquisición en los cuales diferentes compañías ofrecen sus productos. Por último, se encarga de contactar a la compañía ganadora con la dependencia en cuestión para que ésta adquiera los medicamentos. En el caso de la insulina, los últimos dos concursos han sido declarados desiertos ya que el precio ofrecido por Lilly está muy por arriba del precio demandado por la SSA. Las diferentes dependencias del sector tuvieron que adquirir en forma individual el producto a un precio impuesto por Lilly. Existe, además, retraso en la entrega del producto.

#### II.C.2 Consumo aparente.

El consumo aparente en México es igual a la cantidad de insulina que se compra del extranjero. El mercado potencial para la insulina en México no es bien conocido porque no



existen estadísticas completas sobre la enfermedad. Sin embargo, podemos estimar un mercado potencial utilizando porcentajes sobre la población. De datos obtenidos en el INEGI para el crecimiento demográfico, con el censo de 1980 (7) y proyecciones de fecundidad, se puede establecer un mercado potencial. Se presentan a continuación diferentes gráficas donde se observan: a) diferentes panoramas para el mercado de la insulina según los porcentajes reportados por Barrera (23) y Gómez Pérez (25), ver la figura 5. Se presentan líneas que representan el consumo de insulina dependiendo de la cantidad de diabéticos y del consumo diario por persona de insulina en México. b) Los diferentes mercados de los productos utilizados para tratar la Diabetes Mellitus, ver figura 6. c) Los diferentes tipos de insulina consumida por el Sector Salud y el sector privado, figura 7, y d) Dos proyecciones de consumo de insulina en México basadas en dos expectativas de crecimiento de la población (alternativa y programática), figura 8. El crecimiento del consumo de insulina en México se aproximó al incremento de la población por considerarse que casi todos los insulino dependientes tienen una diabetes genética. Esto no es totalmente cierto porque estamos viviendo cambios acelerados en la forma de vida que influyen radicalmente en el crecimiento de la diabetes. El consumo de insulina en México se calculó suponiendo que el consumo diario de insulina por diabético en promedio es de 15 U.I. por día y que el 3% de

## Proyección del consumo insulina en México (%Diabéticos/U.I.)

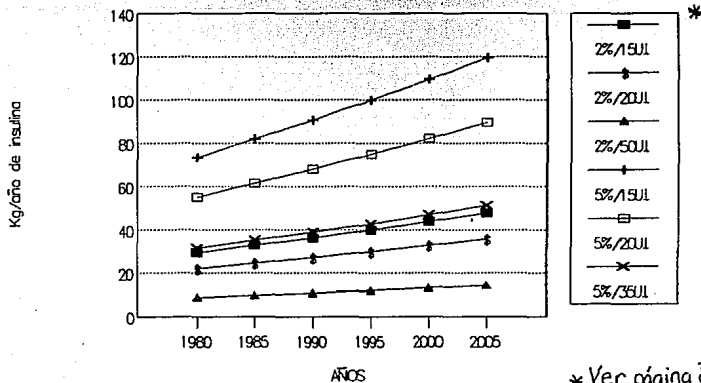


Figura 5

## Consumo de Insulina por sector

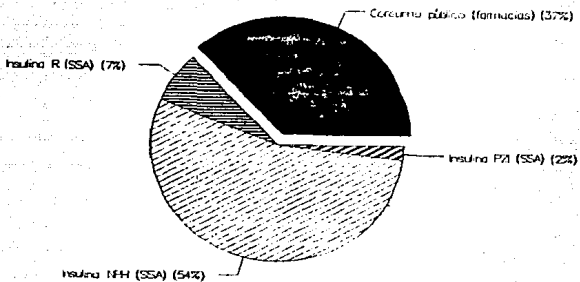


Figura 7

## Porcentaje de uso de diferentes métodos para controlar la Diabetes Mellitus

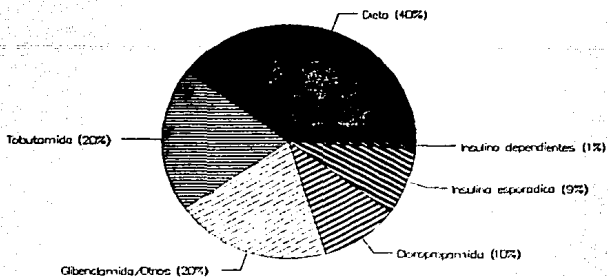


Figura 6

## Proyección del consumo insulina en México (por población)

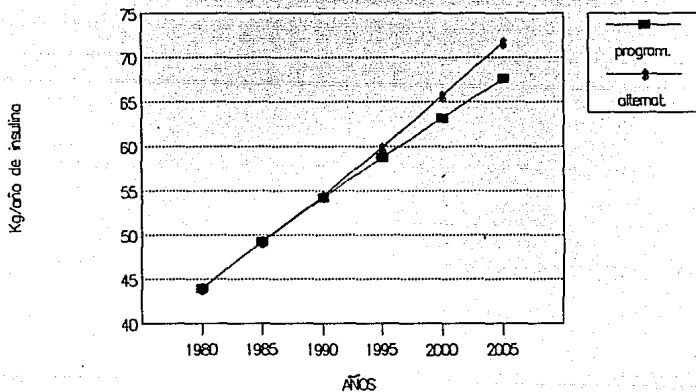


Figura 8

la población en México padece de Diabetes Mellitus. ( Ver sección 4 de este capítulo).

#### II.D Elección del mercado.

De lo dicho anteriormente, podemos conocer con bastante certeza el consumo nacional y los diferentes tipos de mercados que pueden ser atacados o comprendidos por el proyecto.

Sabemos que en 1988 la Secretaría de Salud requirió de 1'222,921 frascos de 300 U.I. de Insulina, es decir 978 millones de U.I. al año ó 39 kilogramos por año (24). Tomando este valor como base se pueden calcular la cantidad de diabéticos en México suponiendo un porcentaje de consumo del sector salud con respecto al consumo nacional y una dosis diaria promedio para los que consumen insulina (insulinodependientes y consumidores esporádicos), ver la tabla que se presenta enseguida. Este grupo se manejará como un solo grupo por carecerse de información más precisa. Los rangos para el porcentaje de consumo del sector salud van de 60 a 75%, y la dosis diaria promedio entre 35 y 10 U.I./día, considerando que la dosis promedio bajará por incluirse a los consumidores esporádicos. Una vez obtenidos los porcentajes de diabéticos en México se pueden comparar con los porcentajes reportados (23) y (25) y entonces encontrar qué por ciento del consumo nacional es del sector salud y la dosis promedio más probable.

Para 1988

%SSA/Nal.	Dosis diaria promedio (U.I./día)			
	35	20	15	10
75	1.20	2.10	2.80	4.20
70	1.29	2.25	3.00	4.50
65	1.39	2.42	3.23	4.85
60	1.50	2.63	3.50	5.26

En la tabla se puede observar claramente que la dosis diaria promedio debe de estar entre 20 y 10 U.I./día. Para valores mayores y menores de dosis promedio los cálculos indican porcentajes de población de diabéticos fuera de los límites (2 al 5% de la población). Normalmente, para otros medicamentos el 70 % del consumo nacional es por parte del sector salud. La dosis diaria supuesta es de 15 U.I./día, si se escoge un valor intermedio, concordando con los valores de dosis diaria por Barrera y Gómez Pérez.

Por consiguiente, para 1988 el consumo nacional calculado es de 56 Kg/año. Por otro lado, tomando precios de 1988 para un frasco de insulina obtenidos en establecimientos comerciales podemos ver los siguiente:

$$\begin{aligned} 19,000 \text{ \$/frasco} &= 475 \text{ millones \$/Kg de insulina} \\ &= 203 \text{ mil USDLLS/Kg de Insulina.} \end{aligned}$$

Si el consumo nacional fué de 56 Kg/año, entonces el gasto anual en la compra de insulina en México (1988) fué de 11.35 millones de dólares. Este valor es congruente con los 2 millones de dólares de importación, para 1988 (Bancomext), ya

que la insulina se importa a granel, se envasa, se etiqueta y se vende, como otros muchos productos farmacéuticos de importación, a un precio de 4 a 6 veces mayor en el mercado nacional.

Podemos conocer el volumen de fermentación para alcanzar una cierta producción de insulina partiendo de las siguientes bases:

1. Para producir un Kg de insulina se requiere de 5 Kg de cadenas (A y B).
2. Las cadenas representan un 20 % de la proteína híbrida.
3. La proteína híbrida representa un 20% de la proteína total.
4. La proteína total es un 65% de la biomasa.
5. Se tiene una eficiencia de recuperación entre el 25y 50%
6. Se alcanza una concentración de biomasa de 20 g/l.
7. Se trabaja 8 meses al año, una fermentación a la semana, es decir 32 fermentaciones al año.
8. El volumen de trabajo del fermentador es el 70% del total.

Se obtienen los siguientes factores según la eficiencia de recuperación de que se trate (25 y 50%):

1.717 y 0.8585 m<sup>3</sup>.año/fermentación.Kg

De aquí se construye la siguiente tabla:

Mercado	Características	tamaño de planta
1.Exportación	Transportación, Comercialización, competencia internl.	planta industrial de gran tamaño.
2.Consumo Nacional	Comercialización, competencia monopolio	planta industrial
3.Sector Salud	Bajo convenio, bajo precio de venta, 3 diferentes productos.	planta industrial
4.Intermedia(SSA)	Bajo convenio, bajo precio de venta.	planta industrial
5.Sector Privado	Comercialización, competencia monopolio.	planta industrial
6.Rápida (SSA)	Bajo convenio, bajo precio de venta.	planta industrial
7.Prolongada(SSA)	Bajo convenio, bajo precio de venta, consumo de protamina.	planta piloto
8.CIIGB	Minima inversión, para pruebas clínicas.	planta piloto

Mercado	Cantidad (Kg/año)	Volumen requerido (m3/semana) efic. ---25%-----50%---	
1	+ 60	103	52
2	56	96	48
3	39	67	34
4	33	57	28
5	17	29.2	14.6
6	4.3	7.4	3.7
7	1.6	2.7	1.4

**Capacidad del CIIGB**

	Cantidad (Kg/año)	Volumen disponible (m3/semana)
efic. 25%---50%	0.3    0.6	0.5

Para poder evaluar técnica y económicamente la metodología desarrollada en la UNAM es necesario escoger uno o varios escenarios para el mismo proyecto.



El primer escenario consiste en evaluar la producción de insulina humana con la capacidad instalada en el CIIGB. Esta elección es casi inmediata debido a que ya se cuenta con una gran parte del equipo, el personal y las instalaciones en el centro. El proyecto consistirá en hacer una planta piloto para terminar la tecnología. Esto quiere decir, escalar el proceso a planta piloto, evaluar las variables de ingeniería que intervendrían a nivel industrial, producir suficiente insulina para hacer pruebas clínicas y realizar una serie de actividades para demostrar su factibilidad.

Se escogió también un segundo escenario porque pensamos que la evaluación de la tecnología no sería completa si la hacemos para la capacidad del centro. En primer lugar porque no se hace una evaluación de un proceso con capacidad industrial y en segundo lugar porque en el primer escenario no se reflejan todas las variables que intervienen en la evaluación económica del proceso ya que se ha realizado una inversión previa en equipo e instalaciones. Es por ello que para realizar una evaluación más real se decidió escoger una planta de mayor capacidad. Para este fin se puede escoger cualquier tamaño, nosotros escogimos la alternativa de insulina rápida para el sector salud pensando en que una empresa cualquiera pudiera crear una planta de producción de insulina utilizando la tecnología desarrollada en la UNAM.

De los datos y suposiciones anteriores se puede construir una proyección para la demanda de insulina rápida por el sector salud. La figura 9 muestra que se empezaría a producir en 1993, debido a que se tardaría por lo menos de 1 año y medio para hacer las pruebas clínicas y 2 años para la construcción de la planta, si se decidiera hacer el proyecto en octubre de 1989. Tomando diez años de operación para la planta se requerirá de por lo menos 8 m<sup>3</sup> de capacidad de fermentación a la semana.

El presente estudio será orientado, pues, a analizar estas dos opciones desde puntos de vista técnicos y económicos con el fin de poder dar alternativas al desarrollo de esta tecnología a nivel industrial.

# Proyección del consumo insulina rápida para el Sector Salud

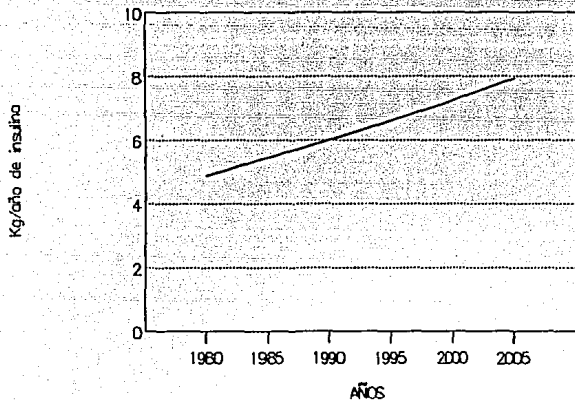


Figura 9

## II.E Bibliografía:

- (1) Lozano, M. y M. Benet "La Guerra de las insulinas", suplemento Sábado, UNO más UNO, Septiembre 14, 1981.
- (2) Larner, J. "Insulina y drogas hipoglucemiantes orales; glucagón" en Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica, 7a.ed, México, Editorial Panamericana, 1988.
- (3) "Drug Evaluations: Agents used to regulate blood glucose" Washington, American Medical Association, Cap.47, 1982.
- (4) Shapley, J. "Human insulin" Nature News, Vol 300, Noviembre 1982.
- (5) Diario Oficial, Martes 23 de Junio de 1987, p.19
- (6) Dickman M. "Höechst and insulin", Nature News, Vol.334, p185 Julio 1988.
- (7) Proyecciones de la población de México y de las entidades federativas: 1980-2010 México, INEGI/CONAPO, 1985
- (8) Fanghanel, F. et.al., "Epidemiología de la Diabetes Mellitus en el Hospital General de México de la S.S.A.", Revista Médica del Hospital General, (México) 39:77, 1985.
- (9) Zubirán, S., Cervantes, A. y R. Rodríguez, "La Diabetes Mellitus como problema de salud pública", Revista Investigación Clínica (México), 13:311, 1961.
- (10) Diario Oficial, Lunes 18 de Julio de 1988, p. 68.
- (11) Lee Ramos, A.F. et.al. "Estudio sobre egresos hospitalarios de Diabetes Mellitus durante 7 años, a nivel nacional en el Instituto Mexicano del Seguro Social, 1980-1986" Revista Médica del IMSS (México), 27:141, 1983.
- (12) Barrera, J., Programa Nacional de Prevención y control de la Diabetes Mellitus para 1982, Secretaría de Salud, Dirección General de medicina preventiva, Departamento de Prevención y Control de la Diabetes Mellitus.
- (13) Barrera, J., Procedimientos Generales del Club del Diabético, (1987)

- (14) Crea, R. et.al. "Chemical Synthesis of genes for human insulin" Proceedings of the National Academy of Science (EUA), 75:5764, 1978.
- (15) Goeddel, D.V., Bolivar, F. et.al. "Expression in E.Coli of chemically synthesized genes for human insulin" Proceedings of the National Academy of Science (EUA) 76:106, 1979.
- (16) Haggdorn, H.C. et.al. "Protamine insulinate" J.A.M.A. 106:177, 1936.
- (17) Home, P.D. y K.G. Alberti "The new insulins. Their characteristics and clinical implications" Drugs, 24:401, 1982.
- (18) Itakura, K. et.al. "Expression in E.Coli of a chemically synthesized gene for the hormone Somatostatine" Science, Vol 198, 1977.
- (19) Keen, H. et.al. "Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycemic potency in healthy men" The Lancet, 2:398, 1980.
- (20) "International Symposium on Human Insulin, Karam, J.H. y D.D. Etzwiler (editores), Diabetes Care, 6:1, 1983.
- (21) Ullrich, A. et.al. "Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequence" Science, 196:1313, 1977.
- (22) Villa-Komaroff, L. et.al. "A bacterial clone synthesizing proinsulin" Proceedings of the National Academy of Science (EUA). 75:3727, 1978.
- (23) Barrera, J. Director del Programa Nacional de Diabetes (SSA), Director del Club del Diabético; comunicación personal, Ciudad de México, 23 de Mayo de 1989.
- (24) Becerril, A., Director de la División de Medicamentos de la Dirección General de Adquisiciones de la Secretaría de Salud; comunicación personal, Ciudad de México, 5 de Junio de 1989.
- (25) Gómez-Pérez, F. Diabetólogo de la Clínica de Diabetes del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán; comunicación personal, Ciudad de México, 16 de Mayo 1989.

(26) Pérez-Palacios, G., Jefe del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán; comunicación personal Ciudad de México, 7 de Junio de 1989.

### CAPITULO III

#### ESTUDIO TECNICO

##### III.A Descripción detallada de la tecnología.

El proceso de fabricación de la insulina consta de tres etapas principales. La primera es la producción de los microorganismos mediante fermentación. Los microorganismos se encargarán de producir la proteína híbrida, donde se encuentra unida la cadena A o B. La etapa siguiente es la separación de la cadena (A o B) de la proteína híbrida con su subsecuente purificación. La última etapa es la asociación de las cadenas, es decir, la formación de la insulina. A continuación se describirá detalladamente los pasos en la elaboración del péptido. Toda la información del proceso a escala laboratorio fué obtenida directamente en el CIIRB mediante entrevistas y publicaciones del centro (9,10,41,57). Como la tecnología está en un proceso de desarrollo presenta constantes cambios. Se tomó como base la técnica utilizada hasta junio de 1989.

En la figura 1 se representa el proceso a nivel laboratorio mostrando con mayor detalle cada paso.

La fermentación se lleva a cabo colocando el inóculo en el medio de cultivo, mismo que se diseñó considerando que los microorganismos van a crecer limitados por la fuente de carbono y que los rendimientos en base a fuente de carbono y nitrógeno son 0.3 g célula/ g glucosa y 4.5 g célula/g NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

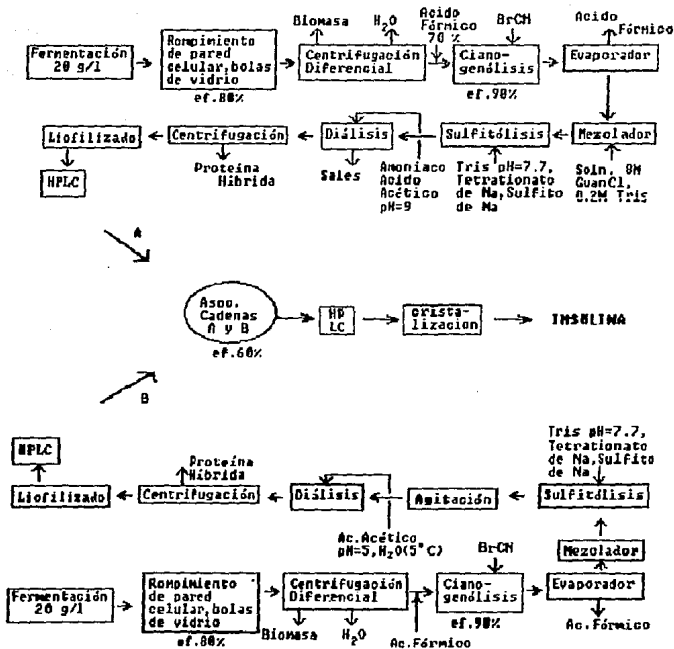


Figura 1 Diagrama de bloques para la producción de insulina humana C11C2 a nivel laboratorio



Sustancia	Concentración g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	4.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2
Glucosa	66
Extracto de levadura	5
Trazas	3 ml

El crecimiento de los microorganismos se logra a una temperatura de 30°C para cadena A y de 37°C para cadena B. El pH se mantiene constante en un valor alrededor de 7 para A y 7.4 para B. La fermentación aeróbica se logra agitando mediante impulsores, cuya velocidad varía de acuerdo al volumen de fermentación, y suministrando aire en una proporción de aproximadamente 1 vvm. El tiempo necesario que debe durar la fermentación para lograr una concentración 10 veces mayor que el inóculo es de aproximadamente 15 horas; en el momento en que se llega a obtener la concentración requerida es necesario inducir la producción de proteína híbrida dentro de las células. Para cadena A se logra aumentando la temperatura del medio de fermentación hasta 42 °C, en un tiempo menor a tres minutos, y manteniendo esta temperatura durante casi tres horas. Para aumentar la temperatura se separa a la células filtrando o con centrifuga y resuspendiéndolas en un medio a 42 °C o mezclando el medio original con agua a mayor temperatura.

En el caso de cadena B la inducción se logra al eliminar triptofano del medio de cultivo, es decir las células no producen la proteína híbrida si existe triptofano en el medio. Se agrega el aminoácido al medio durante el crecimiento y cuando se quiere iniciar la producción de la proteína se separa la biomasa del medio mediante filtración o centrifugación para después resuspender en un medio libre de triptofano. La inducción también se lleva a cabo en un periodo de 3 horas.

La proteína híbrida es almacenada dentro de las células en cavidades llamadas cuerpos de inclusión, por que es necesario romper la pared celular para poder obtener la proteína. Las células se lisan haciéndolas pasar por un sonicador. Esto es similar para ambas cadenas.

Después de romper las células se obtiene una mezcla de restos celulares, DNA, diversas proteínas y proteína híbrida entre otros componentes. Por esto, es necesario separar la proteína híbrida de los restos celulares.

Para poder purificar la proteína híbrida en el caso del péptido B se utiliza la centrifugación diferencial (6000 rpm, durante 5 minutos) y en el caso de cadena A no se ha encontrado el método adecuado para lograr esto. Se ha intentado con centrifugación diferencial sin tener aparentemente buenos resultados y se planea hacerlo por filtración en gel o por una columna de intercambio iónico.

La proteína híbrida ya purificada es entonces preparada para su rompimiento y liberación de la cadena respectiva. Esto se hace disolviendo la proteína en ácido fórmico al 70 % en una proporción de 14 ml de solución por gramo de proteína híbrida. La disolución se lleva a cabo a temperatura ambiente y debe de lograrse una solubilidad total.

El sitio de unión entre la cadena y el resto de la proteína es el monómero metionina. El CNBr es un agente proteolítico específico para metionina en un pH ácido. La reacción se lleva a cabo agregando CNBr a la proteína disuelta en una proporción de 1 g de CNBr / g de proteína híbrida. Esta reacción se debe efectuar en ausencia de luz y a temperatura ambiente durante un periodo de 15 horas. Esta reacción tiene un rendimiento de casi 90 %. Las condiciones y el procedimiento son similares para ambas cadenas. Es importante aclarar que se produce algo de ácido cianhídrico, pero no sabe cuanto. Se debe trabajar en la campana para evitar fugas.

Concluida la reacción se quita el ácido fórmico porque la siguiente reacción requiere condiciones básicas. Se evapora en vacío, a una temperatura de 30°C, para evitar la degradación de las proteínas. Se lava la proteína para remover los restos de ácido fórmico y de cianhídrico para después evaporar en un rotavapor aproximadamente en una hora.

El siguiente paso es producir los derivados sulfonados. Se disuelve la cadena y la proteína en una solución de cloruro de guanidinio 8M en una proporción de 12 ml de solución por cada gramo de péptidos con un pH de alrededor de 7.6 mediante un buffer de cloruro de amonio. Las proteínas pierden su estructura natural y forman estructuras lineales al disolverse en el cloruro de guanidinio pudiéndose así, llevar a cabo la reacción de sulfitólisis. Cuando se logra disolver la mayor parte de la mezcla de péptidos se agrega el tetratoato de sodio y el sulfito de sodio en una proporción de 0.25 g y 0.5 g respectivamente por gramo de mezcla peptídica. Estos reactivos son los oxidantes. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y por 15 horas. El rendimiento de la reacción es de 99 %. Una vez que las proteínas se encuentran sulfonadas se procede a purificarlas.

La purificación de éstas empieza por llevar al derivado de cadena B a un pH de 5 para precipitarlo y pasar a centrifugarlo o ultrafiltrarlo. En el caso de cadena A se pasa directo a la centrifuga (10,000 rpm) o al ultrafiltro. En esta etapa se debe de separar la proteína híbrida de los derivados, los cuales deben quedar en la fase acuosa. Previamente a la purificación en HPLC, se debe de tener una concentración baja de sales, es necesario eliminar una gran cantidad de sales disueltas con un sistema de diálisis con bolsas cut-off malla 1000 durante 6 horas.

También es necesario concentrar la solución antes de la cromatografía. En el laboratorio se secan totalmente por liofilización. Se procede a la purificación por medio de cromatografía líquida de alta presión ( HPLC ).

Primero se disuelven los derivados en una solución de urea 3M. La purificación se lleva a cabo en una columna de fase reversa empleando la metodología utilizada por Ladrón de Guevara, Bolívar et.al. (55). La columna es empacada con Radial-Pak mu-Bondapak C18 (10cm\*8mm I.D., 10 micrómetros). Se utilizan tres eluyentes: el eluyente Aa que esta constituido por 0.0125% de ácido trifluoroacético en agua ultra-pura (pH 3.2) para cadena A, el Ab con 0.5% de ácido fórmico en agua ultra-pura (pH=2.7) para cadena B; y el eluyente B que es acetonitrilo para las dos cadenas. Para el procedimiento de purificación de cadena A se utiliza un minuto 100% de eluyente A y luego un gradiente convexo de 0 a 25% de eluyente B en eluyente Aa, a un flujo de 2.5 ml/min. Para la cadena B se usa 100% eluyente Ab durante 5 min, y luego un gradiente convexo de 0 a 40 % de eluyente B en eluyente Ab, con un flujo de 2.5 ml/min. La detección se logra por medio de UV a 280 nm para ambas cadenas. El tiempo en el cual se logra la separación depende del aparato que se esté utilizando. Se obtiene un producto con una pureza de 99%. Si se van a guardar las cadenas se tendría que liofilizar nuevamente.

Una vez que se han obtenido las dos cadenas purificadas se lleva a cabo la asociación. Para producir la insulina se necesita una proporción de dos gramos de cadena A por un gramo de cadena B. Se obtiene un rendimiento del 60 % con respecto a la cadena B. Se disuelve la cadena A en fase acuosa con un buffer de Tris-glicina (pH 10.5) y se agrega Ditiotreitól ( DTT ) como agente reductor en una proporción de 0.1 g de DTT por cada g de cadena. Posteriormente, se agrega la cadena B. Debe existir una concentración de proteínas entre 5 y 10 g por litro. La reacción se realiza a una temperatura de 5 °C (60) o de 43°C (59) y durante aproximadamente 18 horas. En el laboratorio se llevó a cabo la reacción a 5°C.

Transcurrido el tiempo necesario para la asociación se separa la insulina de los productos de reacción mal asociados y del resto de cadenas no asociadas. La purificación se lleva a cabo en un sistema HPLC con condiciones muy similares a las que se utilizan para la cadena B. También se ha logrado esta separación mediante un sistema de HPLC con una columna de intercambio iónico empleando un gradiente de concentraciones de cloruro de sodio. Después de la asociación se obtiene una solución de insulina, la cual debe de ser recristalizada, para obtener una mayor pureza en el producto final que es la forma en que se debe administrar clínicamente.

Para obtener la insulina de acción rápida es necesario recristalizar el producto en un medio que contenga zinc. La cristalización se lleva a cabo agregando a la solución de insulina cloruro de zinc en una proporción de 1% en peso. Así, el producto puede ser utilizado en el tratamiento de la Diabetes Mellitus.

Es importante aclarar que en fechas recientes la metodología para cadena A se ha desechado por tener muchos problemas en la purificación.

### III.B Bases de Diseño.

Las bases de diseño se dividieron en tres categorías :

- 1) Para el lugar de ubicación
- 2) Del proceso
- 3) En los servicios necesarios

#### 1) Para el lugar de ubicación :

Lugar : instalaciones del Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM, ubicado el 1a parte Noroeste de la Cd. de Cuernavaca, Edo. de Morelos.

Altitud: 1560 MSNM

Ubicación geográfica:

Latitud Norte = 18 grados 55 min.

Latitud Oeste = 99 grados 15 min.

Presión barométrica: 635 mmHg

Precipitación pluvial:

Máxima por día/ y anual: 58 mm3/ 1030.3 mm3

Días por año: 90

Humedad relativa:

minima:40%

máxima:70%

promedio:60%

Ambiente corrosivo: No existe

Climatología: Existe granizo, niebla y rocío.

Vías de comunicación: Autopista México-Cuernavaca

Aeropuerto (Tequesquitengo, Mor.)

Ferrocarril



## 2) Del Proceso:

Materias primas	Condiciones al límite de batería		
	Temperatura	Edo. físico	Presión
Inóculo	37°C	Soln.	---
CNBr	18°C	Soln.	---
Acido Fórmico	(10-20°C)	Soln.	---
Cloruro de Guanidinio	18°C	Soln.	---
Tetrationato de Sodio	18°C	Soln.	---
Sulfito de Sodio	18°C	Soln.	---
Agua de proceso	18°C	Liq.	---
Aire para la fermentación	25°C	Gas.	635mmHg

(Todos los reactivos se guardan en un almacén por un periodo determinado. El agua y el aire se obtienen continuamente.)

El producto terminado es Insulina humana en solución acuosa precipitada en presencia de cloruro de zinc, altamente purificada (acción rápida), en una concentración de 4 mg/ml (100 U.I./ml). No debe de contener más de 10 ppm de proinsulina y una cuenta bacteriana mayor a 100 por gramo de insulina.

Condiciones fijas de proceso:

Concentración de biomasa final (fermentador): 20 g/l

Conversión de las reacciones:

Cianogenólisis: 90 %

Sulfitólisis: 99 %

En el diseño :

Debido a que la metodología para cadena A se ha eliminado y que no se sabe aún nada sobre la nueva manera de producirla, se supondrá que cadena A se podrá obtener de la misma forma en que se obtiene cadena B.

El volumen de operación será un 70 % del volumen nominal.

La eficiencia mecánica de las bombas será de un 70%.

Condiciones de almacenamiento:

Se contará con un almacén con la capacidad y la infraestructura (refrigeración) para alojar tanto la materia prima como los productos intermedios (cadena A y B) y el producto final, durante la producción de un año.

Días de operación:

Escenario I (pruebas clínicas):

Producción para 1000 diabéticos/año

es 231 g de insulina = 6000 frascos

Se tiene que trabajar 24 semanas al

año , 6 días a la semana, 3 turnos.

Se producirá cadena A durante 16 semanas

y cadena B durante 8 semanas al año.

La asociación se llevará acabo 4 veces al año  
Escenario II (Insulina rápida Sector Salud);

Para cubrir la demanda (8 m3/semana),  
33 semanas, 6 días a la semana, 3 turnos.  
22 semanas para cadena A y 11 para B.

Se asociará 8 veces al año.

No se trabajará durante el resto del año  
en la producción de insulina por tratarse de  
una planta multi-propósitos.

### 3) En los servicios auxiliares.

Vapor : se generará el necesario dentro de la planta  
mediante una caldera de 100 Caballos (escenario I), 500 CV  
para (escenario II), que producirá vapor de 7 Kg/cm<sup>2</sup>, vapor  
saturado, contará con un equipo para suavizar agua por  
resinas de intercambio, y operará con diesel centrifugado.

Electricidad : Se contará con sistema 110/220, con una  
planta auxiliar a la que están conectados los fermentadores.  
(tardará de 30-40 segundos en resumistrarla).

#### Agua :

##### De proceso:

calidad: baja dureza , libre de patógenos.

fuelle: Servicio de agua potable de la Cd. de  
Cuernavaca.

temperatura: 18°C

De alimentación a la caldera:

calidad: baja dureza

fuelle: Servicio de agua potable de la Cd. de Cuernavaca.

temperatura: 18 °C

Agua potable:

calidad: libre de patógenos, potable.

fuelle: Servicio de agua potable de la Cd. de Cuernavaca.

Agua contra incendio:

disponibilidad: Se contará con un sistema de suministro en caso de emergencia.

Vacio: Se cuenta con equipo de vacio de hasta 580 mmHg de vacio, por bomba de vacio de 2 HP.

Aire: Se cuenta con una compresora libre de aceite de 30 HP.

### III.C Análisis del Sistema de Producción.

#### III.C.1 Líneas de producción.

Debido a que las cadenas se producen por separado, para lograr una producción de tamaño considerable, deben existir diversos modos de producción que varíe de acuerdo con los objetivos o capacidades que se requieran.

Se pueden producir ambas cadenas en sistemas por separado, es decir, tener dos sistemas de fermentación, dos sistemas de purificación y un sistema de unión. (modo A)

Otro método sería tener un solo sistema de fermentación, un único tren de purificación y el sistema de unión. Para producir una sola cadena y almacenarla mientras se produce la otra, y unir las después. (modo B).

Una tercera alternativa de producción es el tener dos sistemas de fermentación: uno para cada cadena. Funcionando de forma alternada para poder ser tratados en un solo sistema de purificación. En este caso, no es necesario almacenar por periodos prolongados pues mientras un péptido es purificado el otro estaría listo para la asociación. (modo C).

La principal ventaja de la alternativa A es que el tiempo de producción es muy corto comparado con las demás alternativas pero con la gran desventaja de que se trata del más costoso. En el caso del modo B, su principal ventaja es que es un sistema que puede ser adaptado a otros productos intracelulares con tecnologías rDNA, además que es el menos costoso. Su desventaja es que el tiempo de producción es

mayor y también el almacenamiento puede acarrear mayores costos. El sistema C tiene como ventajas con respecto al B que el tiempo de producción será menor y no es necesario un periodo de almacenamiento prolongado. Tiene desventajas tales como la necesidad de tener mayores cuidados en la purificación para evitar contaminación de una cadena con la otra antes de la unión.

En el caso del Escenario I, la mejor alternativa es la B. Debido a que la capacidad que se va a manejar es pequeña y el almacenar no implica ningún problema. Los costos son menores y el tiempo no es un factor determinante.

Para el segundo escenario la mejor alternativa es también la B. Pues tampoco presenta problemas de almacenamiento y como es la opción más versátil, es más congruente con el objetivo de conformar una planta multipropósitos. También se plantea el tener dos fermentadores de 4 m<sup>3</sup> en lugar de uno de 8 m<sup>3</sup>. En cuestión de productividad no presenta ventajas el tener uno o dos tanques. En cuestión de operación es más conveniente tener dos tanques. Primero porque si se llega a contaminar el tanque se perdería toda la producción. Segundo, cabe la posibilidad de que se tenga que retener el volumen de un tanque durante la operación.

### III.C.2 Continuo/Lotes:

Podemos plantear qué sería más conveniente: si trabajar la fermentación continuamente o por lotes. La principal razón para trabajar en lotes es que se está pensando en una planta multipropósitos en la que se producen una variedad de productos durante el año. Este tipo de operación nos da la facilidad de intercambiar procesos de una semana a otra. Por otro lado según Wang et.al. (3) si comparamos las productividades de los dos procesos se llega a la siguiente ecuación (3):

$$\text{Prod(cont)}/\text{Prod(lot)} = (\ln(X_m/X_o) + \mu_{Um}T) * \mu_{Um} * Y / ((X_m - X_o) / X_m)$$

donde:  $\mu_{Um}$  = Velocidad específica de crecimiento

T = tiempo preparación y tiempo fase lag

$X_m, X_o$  = concentraciones final e inicial de biomasa

Suponiendo:  $X_m = 20\text{g/l}$ ,  $X_o/X_m = 0.1$ ,  $Y = 0.3\text{g cel/g f. carbón}$ ,  
T = 4 horas para (Esc.I) y 8 horas (Esc.II)

TABLA 1

MUm	Pcont/Pbatch (Escenario I)	Pcont/Pbatch (Escenario II)
0.05	0.0417	0.0450
0.10	0.0901	0.1034
0.20	0.2068	0.2602
0.30	0.3503	0.4703
0.50	0.7171	1.0504
0.80	1.4674	2.3207
1.00	2.1009	3.4342
1.20	2.8410	4.7610

En la tabla anterior podemos ver que mientras mayores sean el volumen de producción y la velocidad de crecimiento, será más conveniente hacer continuo el proceso. En este caso, por tener volúmenes de producción chicos y bajas velocidades de crecimiento, por tratarse de un organismo recombinante el cual pierde con facilidad los plásmidos a velocidades mayores de 0.3 (20,21), es mucho más conveniente hacerlo por lotes.

### III.C.3 Pasos del proceso a escala mayor:

Con base en la información obtenida por el grupo de laboratorio y la literatura para este tipo de productos (intracelulares) (1,44), proponemos los siguientes pasos necesarios para lograr la obtención del producto en una escala mayor (ver figura 2):

-Fermentación: producción de la biomasa requerida.



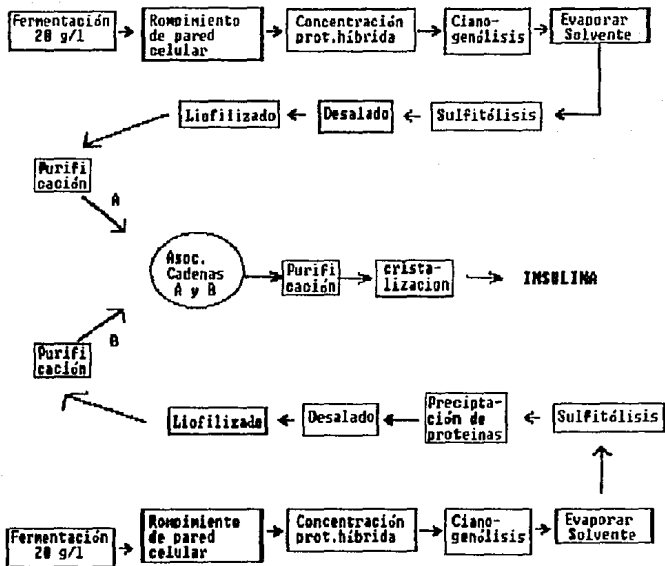


Diagrama de bloques para la tecnología CIIGB a nivel planta piloto e industrial

Figura 2

-Purificación, con los siguientes pasos :

Concentración: Reducir el volumen de trabajo.

Rompimiento: Romper las células y dejar así libre a las proteínas.

Clarificación: Eliminar a los restos celulares y concentrar las proteínas híbridas.

Cianogenólisis: Separar químicamente a la cadena del resto de la proteína híbrida.

Sulfitólisis: Sulfonar las cadenas, protegiéndolas y preparándolas para su posterior asociación.

Diafiltración: Eliminar las sales del medio, para evitar problemas en el paso de cromatografía.

Concentración: Para tener mayor eficiencia en la cromatografía.

Cromatografía líquida de alta presión: Separa con alto grado de eficiencia a las cadenas sulfonadas del resto de los péptidos.

Liofilización: Eliminar totalmente el medio en el que se encuentran las cadenas para que puedan ser almacenadas por periodos largos.

Asociación, con los siguientes pasos :

Reacción de asociación: Mezclar ambos péptidos para formar insulina.

Purificación (HPLC): Separar a la insulina de los péptidos mal asociados o no asociados.

Diafiltración: Quitar el exceso de sales producto de la cromatografía de intercambio iónico.

Cristalización: Formar los cristales de insulina y zinc para poder utilizarla.

En la figura 2 cambiaron poco los pasos comparando el nivel laboratorio con la escala industrial. Esto se debe a la falta de información precisa y cuantificada de los pasos a nivel laboratorio. Cuando se tenga una mayor información se podrán hacer mayores cambios. Se hicieron los siguientes cambios: el método de enriquecimiento se tiene que hacer en dos pasos. Se omitió el paso de liofilización después de la diálisis, diafiltrando y concentrando mediante ultrafiltración en un mismo aparato. Por último se tuvo que incorporar una red de enfriamiento de las corrientes para evitar la inactivación de las proteínas durante el proceso. Se incluyeron intercambiadores en las siguientes posiciones; uno después de la fermentación, uno durante el rompimiento, uno después de la sulfitosis y uno después de la asociación. Las temperaturas de las corrientes van de 5 a 10°C.

#### III.C.4 Balances de materia y energía:

En la figura 2 se presenta un diagrama de flujo en forma de bloques que muestra de una manera sencilla el procedimiento propuesto para llevar a cabo la producción de insulina en una escala mayor. Tomando en cuenta la información obtenida directamente en el CIIGB, de las referencias (55,57), y considerando eficiencias en cada paso

que posteriormente se justificarán en el dimensionamiento de los equipos se procedió a hacer el balance de materia y energía.

**BALANCES DE MATERIA: (x semana)**

**ESCENARIO I:**

**-Fermentación:**

El volumen de fermentación es de 350 l y la concentración final de biomasa esperada es de 20 g/l, por lo que se obtendrá 7000 g de biomasa final. Según el medio utilizado para una fermentación de 10 litros en laboratorio (63) se requerirá lo siguiente:

Sustancia	Concentración g/l	requerido g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	1050
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	1050
(NH <sub>4</sub> )HP04	4.5	1575
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2	700
Glucosa	66	23100
Extcto de levadura	5	1750
Trazas	3 ml/l.	1050

#### Concentración:

Fijamos una concentración final para el retenido de 180 g/l y una eficiencia de 99 %. El volumen de retenido es:  $C_f(\text{fermentación}) \cdot \text{eficiencia} / C_f(\text{retenido}) = 7000 \cdot 0.99 / 180 = 38.5$  litros, el volumen del filtrado es la diferencia:  $V_{\text{fermentación}} - V_{\text{retenido}} = 350 - 38.5 = 311.5$  litros. Se tiene 6930 g de célula en el retenido.

#### Rompimiento:

Fijamos una eficiencia de 0.85 %. Cada célula contiene 65 % de proteína y de esta el 20 % es proteína híbrida que se encuentra en los cuerpos de inclusión y cuando se rompe la célula queda libre en el medio. Por lo tanto se tendrá, (con la eficiencia de 85%) 765.8 g de proteína híbrida con una concentración de 19.89 g/l. Tendremos también 6164.2 g de restos celulares que no incluyen a la proteína híbrida.

#### Clarificación:

Fijamos una concentración final de 250 g/l y una eficiencia de 0.97 % por tratarse de por lo menos dos operaciones. La primera operación es separar la proteína híbrida de los restos celulares y la segunda es concentrarla. Al final de la clarificación se tendrá un volumen de 2.97 litros en el retenido, se habrá retirado del sistema 35.53 litros de agua y aproximadamente 6187.2 g de restos celulares. Queda en el retenido 742.8 g de proteína híbrida.

#### Cianogenólisis:

Primero se evapora el agua del retenido quedando hasta un 20 % de agua en peso (se evaporan 2.83 l de agua). Se agrega una solución de ácido fórmico 70% en volumen, 14 ml por cada gramo de proteína híbrida, es decir 10.4 litros. El volumen de reacción es de 10.4 litros. De estos 3.12 litros son de agua y 7.28 litros son de ácido fórmico. Se pone 1 g de CNBr por cada gramo de proteína, es decir 742.8 g de CNBr. La reacción se lleva a cabo con una conversión de 90%. Las cadenas A o B representan aproximadamente el 20 % de la proteína híbrida. Al final tendremos 134 g de cadena A o B y 608.8 del resto de la proteína. El ácido fórmico se evapora y se lava posteriormente con el doble del volumen residual (20%). Al final habremos evaporado 10.4 litros de solución de ácido fórmico y 0.2971 litros de lavado. En total se evaporó 3.127 litros de agua y 10.4 litros de solución de ácido fórmico.

#### Sulfitólisis:

Se usan 12 ml por gramo de proteína de una solución 8 M (764 g/l) de cloruro de guanidinio, 0.5 g de sulfito de sodio por gramo de proteína y 0.25 de tetratoato de sodio. Se tiene que usar 6807 g de cloruro de guanidinio, 371.4 g de sulfito de sodio y 185.7 g de tetratoato de sodio. La conversión es de 99%, al final tendremos 132.66 g de cadena A o B. El volumen de reacción es de 8.91 litros.

#### Diafiltración y concentración:

Esta operación se puede llegar a realizar en varios pasos, la eficiencia es de 98%, fijamos un valor final de concentración de proteína en 250 g/l. El volumen final después de la concentración es de 2.94 litros. Fijamos también la concentración final de sal en 9.5 g/l. Si tenemos 7364 gramos de diferentes sales, entonces se requiere quitar 7334 g de sal, además de 6 litros de agua. Antes de realizar la purificación se necesita añadir suficiente urea para formar una solución 3M (180 g/l) de urea. Se necesitan 529.2 g de urea.

#### Cromatografía líquida de alta presión:

Se alcanza una pureza de 99%, se tiene reportado que se colecta la fracción que contiene a la cadena en 1.5 minutos a un flujo de 150 ml/min. Se obtiene una concentración final de 195 g/l, en un volumen de 0.625 litros. Al final se tendrá 131.3 gramos de cadena A o B purificada.

#### Liofilización:

Si suponemos un 1% residual de humedad entonces tendremos que quitar 1.65 litros de agua.

#### Inactivación:

Suponiendo que existe 5% de inactivación en cada paso, y tenemos 10 pasos por lo menos se inactivará por lo menos un 59.87 % de las cadenas. Antes de la asociación se producirá 78.62 g/semana de cadena A o B.

#### Reacción de asociación:

Se trabajará 24 semanas al año: se tendrá 1257.6 g de cadena A/año y 628.8 g de cadena B al año. Se pretende hacer 4 reacciones al año, por cada reacción se necesitará 314.4 g cadena A y 157.2 g de cadena B. Se va a necesitar 0.15 litros de buffer tris-glicina/g cadena A (6 g tris/l y 3.75 g glicina/l), y 3.75 g de DTT/litro. El volumen de reacción será de 44.93 litros, y se requerirá de 269.6 g de tris, 168.5 g de glicina, 53.92 gramos de DTT. La reacción y tiene una conversión de 60% sobre cadena B, en total se obtendrá 89.86 g de insulina por cada reacción.

#### Concentración:

Se tendrá una concentración de 250 g/l en el retenido y una eficiencia de 0.99 %. El volumen del retenido será de 1.78 litros y el de filtrado de 43.15 litros.

#### Purificación (HPLC):

Se purifica mediante un gradiente iónico, y suponemos, a falta de mayor información, que se utilizarán las mismas condiciones (en cuanto a tiempo y flujo) que se utilizaron para la purificación de las cadenas. Se tiene 99% de pureza, 88.96 gramos de insulina. Con un flujo de 150 ml/min y 1.5 minutos de colectado se obtiene un volumen final de 0.45 litros, y una concentración de 197.7 g/l.



#### Diafiltración:

Se quita la sal que se utilizó para la el gradiente en cromatografía. No se tienen más datos al respecto.

#### Cristalización:

Se requiere 1% en peso de cloruro de zinc para cristalizar, es decir 0.89 g de cloruro de zinc.

#### Inactivación:

Se llevaron acabo 5 pasos y se inactivaron 5% en cada uno. Se tiene al final 68.83 g de insulina. En total se producirá 275.34 g de insulina al año. Teóricamente se debería de producir 873.6 g/año. Se tiene por lo tanto un rendimiento de 31.52%.

#### ESCENARIO II: (x semana)

Para el escenario II se hicieron las mismas suposiciones, aunque en la asociación se harán 8 reacciones en lugar de 4. A continuación se presentan los resultados:

#### Fermentación:

Volumen de reacción: 5600 litros (2 de 2800)

Concentración final biomasa: 20 g/l

Peso de biomasa final: 112,000 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 16,800 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 16,800 g

(NH<sub>4</sub>)HPO<sub>4</sub>: 25,200 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 11,200 g

Glucosa: 369,600 g

Extcto de levadura: 28,000 g

Trazas: 16,800 ml

Concentración:

Concentración final retenido: 180 g/l

Volumen retenido: 616 litros

Volumen filtrado: 4,984 litros

Peso biomasa: 110,880 g

Rompimiento:

Peso proteína híbrida: 12,252.2 g

Peso restos celulares: 98,627.8 g

Clarificación:

Concentración final retenido: 250 g/l

Volumen retenido: 47.52 litros

Agua retirada del sistema: 568.5 litros

Restos celulares retirados: 98,995.2 g

Peso proteína híbrida: 11,884.8 g

Cianogenólisis:

Volumen de reacción: 166.4 litros

Volumen de agua (soln. 70%): 49.92 litros

Volumen ácido fórmico: 116.48 litros.

Peso CNBr: 11,884.8 g

Peso Cadena A o B: 2,144 g

Peso resto proteína híbrida: 9,740.8 g

Agua evaporada total: 50 litros

Sulfitólisis:

Volumen de reacción: 142.56 litros

Peso cloruro de guanidinio: 108,912 g

Peso sulfito de sodio: 5,942.4 g

Peso tetratiónato de sodio: 2,971.2 g

Peso cadena A o B: 2,138.56 g

Diafiltración y concentración:

Concentración de proteína final: 250 g/l.

Volumen final: 47.04 litros.

Concentración final de sal: 8.5 g/l.

Peso sal retirado: 117,344 g

Volumen agua retirada: 96 litros

Peso urea: 8,467.2 g

Cromatografía líquida de alta presión:

Concentración final: 195 g/l

Volumen final: 10 litros

Peso cadena: 2,100.8 g

Liofilización:

Agua evap: 26.4 litros

Inactivación:

Peso cadena activa: 1,257.98 g

Reacción de asociación:

33 semanas al año y 8 reacciones.

Producción anual de cadena A: 27,675.6 g

Producción anual de cadena B: 13,837.8 g

Peso requerido por reacción cadena A: 3,459.45 g

Peso requerido por reacción cadena B: 1,729.2 g

Volumen de reacción: 494.23 litros

Peso de tris: 2,965.6 g

Peso de glicina: 1,853.5 g

Peso de DTT: 593.12 g

Peso insulina producida por reacción: 988.46 g

Concentración:

Concentración en el retenido: 250 g/l

Volumen en el retenido: 19.58 litros

Volumen del filtrado: 474.65 litros.

Purificación (HPLC):

Peso final de insulina: 978.56 g

Volumen final: 4.95 litros

Concentración final: 197.7 g/l.

Diafiltración:

Se quita la sal que se utilizó para la el gradiente en cromatografía. No se tienen más datos al respecto.

Cristalización:

Peso cloruro de zinc: 9.79 g

Inactivación:

Peso insulina activa: 757.13 g

Producción insulina anual: 6,057 g

Producción teórica anual: 19,219.2 g.

Rendimiento: 31.52 %

BALANCES DE ENERGIA:

ESCENARIO I:

El proceso requiere de 4 intercambiadores. En principio proponemos utilizar el mismo tipo de intercambiador de placas. El fermentador opera a 37 °C y se enfría posteriormente la corriente de proceso a 10 °C con etilenglicol al 10% en agua. El flujo es de 278 l/h. Se

opera con etilenglicol al 10% porque no es corrosivo como una salmuera y es casi igual de viscoso que el agua. El segundo intercambiador (en el homogeneizador) opera con 560 l/h, la corriente de proceso se mantiene a 5°C. El tercero (después de la sulfitólisis) con 185 l/h enfría la corriente a 10°C. El cuarto (después de la asociación) con 40 l/h enfría la corriente a 10°C.

#### ESCENARIO II:

Se emplea el mismo tipo de intercambiador. Las condiciones de proceso son las mismas que en el escenario I. Las corrientes que se necesitan en cada intercambiador son las siguientes:

Intercambiador 1: 4450 l/h

Intercambiador 2: 560 l/h

Intercambiador 3: 2960 l/h

Intercambiador 4: 436 l/h

#### Diagrama de flujo.

El diagrama de flujo final integrado para producción planta piloto e industrial se ve en la figura 3. En el se incluyeron como equipos de separación ultrafiltros. También se pudieron haber incluido centrifugas, la inclusión de cualquiera de los dos equipos se discutirá posteriormente.

#### III.C.5 Distribución de tiempos.

Se muestra en la figura 4 la distribución aproximada de tiempos para los dos procesos. Estos cálculos son preliminares.

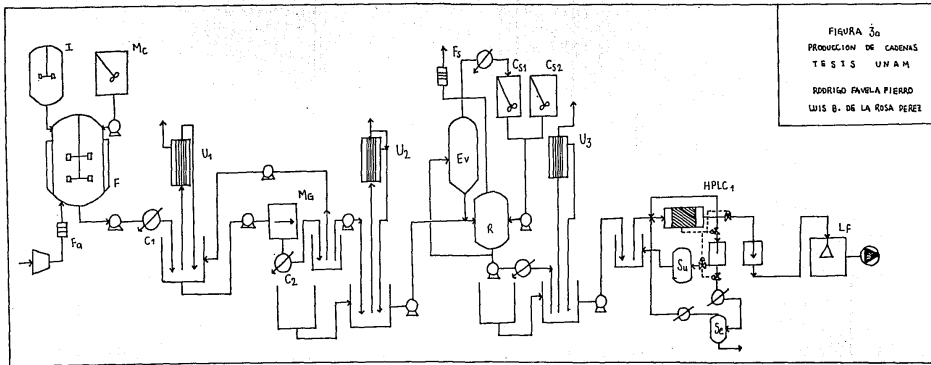
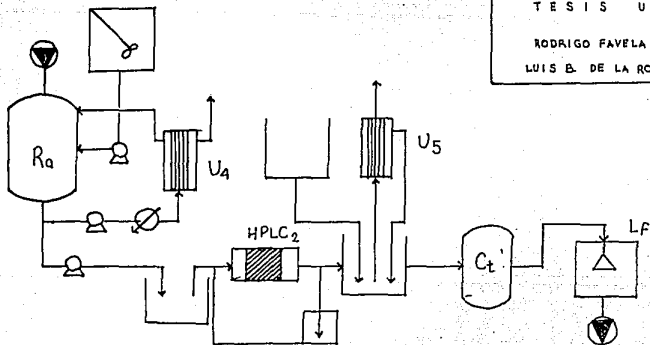


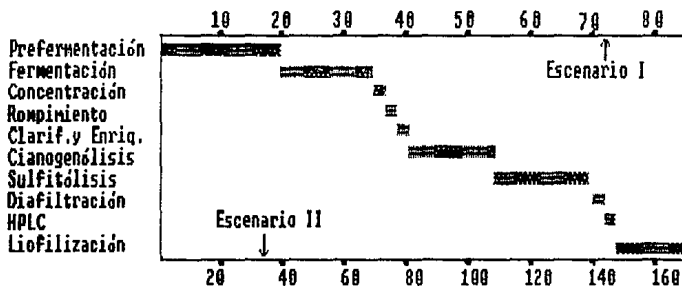
FIGURA 3a  
 PRODUCCION DE CADENAS  
 TESIS UNAM  
 RODRIGO PAVELA PIERAD  
 LUIS B. DE LA ROSA PEREZ

FIGURA 3b  
ASOCIACION DE CADENAS  
TESIS UNAM  
RODRIGO FAVELA FIERRO  
LUIS B. DE LA ROSA PEREZ

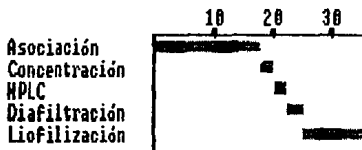




Mc = Medio de cultivo.  
I = Inóculo.  
F = Fermentador.  
Fa = Filtro de aire.  
C1 = Cambiador de calor 1  
U1 = Microfiltro (concentración de biomasa).  
Mg = Manton-Gaulin (Homogeneizador).  
C2 = Cambiador de calor 2  
U2 = Ultrafiltro (clarificación y enriquecimiento).  
R = Reactor para cianogenólisis y sulfitólisis.  
Fs = Filtro de cal sodada para retener gases tóxicos  
Ev = Evaporador de ácido fórmico  
Cs1 = Preparación de reactivos para cianogenólisis  
Cs2 = Preparación de reactivos para sulfitólisis  
U3 = Ultrafiltro (Diafiltración)  
HPLC1 = Cromatografía líquida de alta presión (fase reversa)  
Se = Recuperador de eluyente  
Su = Recuperador de urea  
Lf = Liofilizador  
Ra = Reactor para la asociación  
U4 = Ultrafiltro (concentración de productos).  
HPLC2 = Cromatografía líquida de alta presión (intercambio  
iónico).  
U5 = Ultrafiltro (diafiltración).  
Ct = Cristalizador.



Distribución de tiempos (horas)  
para obtener las cadenas sulfonadas.



Distribución de tiempos (horas)  
para obtener la insulina (asociación)

Distribución aproximada de tiempos para el proyecto  
insulina humana CIIGB (figura 4)

### III.D Dimensionamiento y diseño técnico:

La información y las suposiciones en el dimensionamiento fueron basadas en la bibliografía presentada en este capítulo, en entrevistas y comunicaciones personales efectuadas en el CIIGB con el grupo de trabajo del proyecto de insulina y en folletos comerciales, dado que para muchos equipos no existe información suficiente en los libros.

#### III.D.1 Analisis técnico del escenario I:

##### III.D.1.a Preparación del inóculo:

Para lograr alcanzar el volumen de 350 l es necesario efectuar antes dos fermentaciones de menor tamaño. Primero se utilizará un fermentador con una capacidad de operación de 1 litro (Diámetro tanque = 0.1449 m, Area interior = 0.0147 m<sup>2</sup>, Altura liquido/Diámetro tanque = 1, Diámetro impulsor/Diámetro tanque = 1/3), y luego uno de 10 litros (Dt=0.2225 m, Aint=0.2335 m<sup>2</sup>, H/D=1, Di/Dt=1/3). Para la cinética de crecimiento y la productividad se utilizaron la ecuación de crecimiento logarítmico;  $t = 1/\mu \ln(X_f/X_0)$  y la ecuación de productividad para fermentaciones por lotes;  $P = X_f / (t_0 + t_{lag} + 1/\mu \ln(X_f/X_0))$ . Donde  $X_f$  y  $X_0$  son las concentraciones de biomasa final e inicial respectivamente,  $t_0$  y  $t_{lag}$  son los tiempos muerto y de fase lag. El valor de  $\mu = 0.3h^{-1}$ , es un valor apropiado para crecimiento de microorganismos recombinantes (63). También se habla de valores similares en (20). Se supone una

concentración final de 20 g/l porque se han alcanzado concentraciones finales de 10 g/l sin optimizar, la fermentación (63) y se han reportado concentraciones hasta de 48 g/l (10).

La siguiente tabla muestra los valores de productividad y sus características para las fermentaciones antes de alcanzar el volumen de 350 litros.

Tabla 2

Vol(l)	Xo(g/l)	Xf(g/l)	to(h)	tlag(h)	t(h)	P(g/l-h)
1	2	20	1	1	7.67	2
10	2	20	1	1	7.67	2

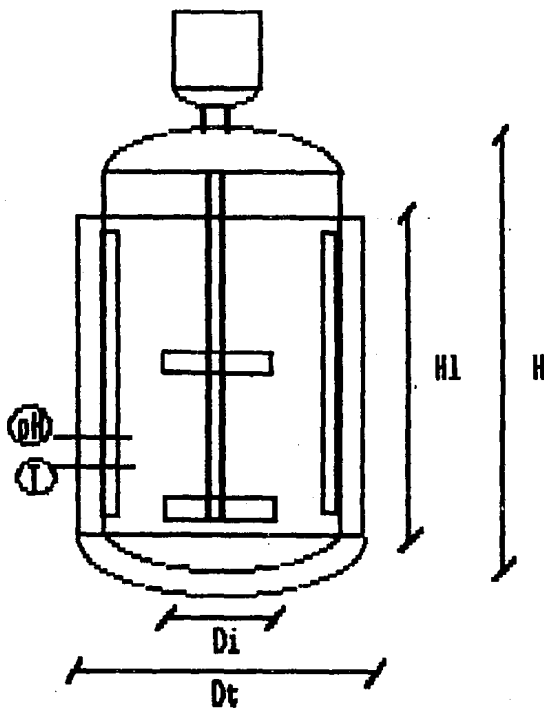
#### III.D.1.b Fermentación:

Todos los cálculos del fermentador se hicieron suponiendo que la cepa utilizada para la fermentación de la cadena A crece y se induce a las mismas condiciones que la cepa para la cadena B.

#### Dimensiones del tanque de fermentación:

Para el escenario I se cuenta con un tanque de 350 lts (vol. de operación) en el centro por lo cual no es necesario calcular sus dimensiones. El tanque es cilíndrico, de cuatro baffles, cuenta con un sistema de impulsores de turbina de 6 aspas, esta encaquetado y tiene sistemas de control de temperatura y pH automáticos. Esta construido de acero inoxidable. (ver figura 5).

Dimensiones de un fermentador típico.  
figura 5



Calor generado durante la fermentación:

Se generará aproximadamente 7747 kcal/h, se necesitará de un flujo de agua de 553 Kg/h. El flujo de agua saldrá a 32 °C. Todos los cálculos se pueden revisar en el apéndice III.

Potencia y Aereación:

Para el cálculo de tiempos de fermentación y productividad se recurrió a las mismas fórmulas y suposiciones que en la parte de preparación del inóculo.

$X_0=0.5714$  g/l,  $X_f=20$  g/l,  $t_0=3$ h,  $t_{lag}=2$ h,  $t=11.86$ h,  
 $P=1.183$  g/l-h

### Diseño del fermentador:

Se utilizaron las suposiciones y métodos citados en el Apéndice II.

Tabla 3

Características del fermentador del escenario I	
Vol nom	500 lts
Vol trabajo	350 lts
Num. turbinas	2 (6 aspas planas)
Dtanque	0.6 m
Dimpulsor	0.2 m
H(altura liq.)	1.2 m
Htotal	1.768m
Material tanque	Acero inoxidable (316)
4 Baffles	0.06m ancho
P aereada	0.3655 Hp
P/V	777.685 W/m <sup>3</sup>
Flujo aire	5.83e-3 m <sup>3</sup> /s(1vvm)
Pg/Po	0.33
rpm	345
Capacidad motor (70%ef)	1.5 Hp

### Medio de cultivo e inducción:

Se utilizará el medio de cultivo que se usa en laboratorio (63) y que se describe en la primera parte de este capítulo.

Por tratarse de una fermentación limitada por la fuente de carbono se tiene que alimentar poco a poco la glucosa. Esto es porque se requieren velocidades de crecimiento lentas para que no se pierda el plásmido. Se alimenta glucosa (60%) conforme lo requieran las células. Este medio fué probado en laboratorio (63) en una fermentación de 10 litros con buenos resultados. En la figura 6 se puede

Curva de crecimiento teorica

E.Coli ( $\mu=0.3$ ,  $X_0=0.57$ )

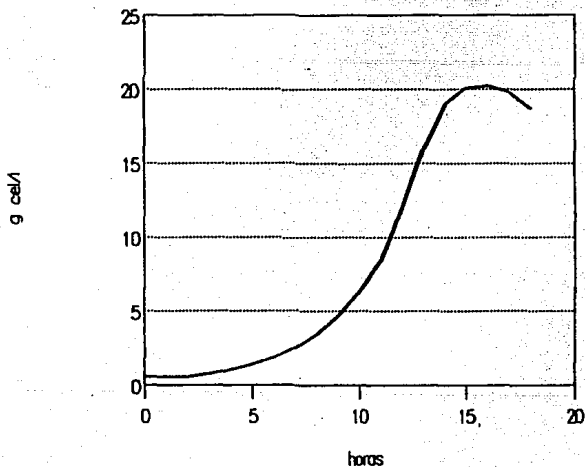


Figura 6



apreciar la curva teórica de crecimiento de esta fermentación.

La inducción del producto se lleva a cabo hasta que se obtenga la concentración final de células, que dura de 2 a 3 horas. Durante el crecimiento se reprime la inducción por la presencia de una concentración determinada de triptofano en el medio. La inducción se puede llevar a cabo agregando continuamente triptofano y dejando de agregar cuando se quiera inducir, o poniendo una concentración inicial de triptofano de tal manera que al finalizar el crecimiento se llegue a la concentración de inducción. Durante los experimentos realizados en el CIIGB, se encontró que para una fermentación donde:  $X_f/X_0=35$ ,  $\mu=0.15$ ,  $X_f=10$  g/l y tiempo(f)= 21 hrs, se requirió agregar tres veces triptofano durante la fermentación. Se mantuvo una concentración en el medio reaccionante de 0.05 g triptofano /l.

Esterilización del medio de cultivo:

El CIIGB tiene actualmente una caldera que produce vapor saturado de 7 Kg/cm<sup>2</sup>, con una potencia de 100 CV. Tomando 635 mmHg como presión atmosférica en Cuernavaca, se tiene un vapor a una presión de 112 psia o 7.6 atm, con una temperatura de 168.9°C o 336 °F (17).

La potencia es de 100 CV =74.5 KW, si tomamos el calor latente como 2048 KJ/kg, el flujo disponible es de 0.0364 kg/s o 130.94 kg/h.

Para lograr la esterilización se tomó en cuenta un criterio de esterilidad de una fermentación contaminada por cada mil y la concentración inicial de microorganismos en el medio de 1,000,000 micro/ml. El criterio de diseño ( $\Delta = \ln N_f/N_o$ ) fué de -35.57.

Se prefiere calentar con vapor en la camisa, porque el calentar eléctricamente demanda una mayor cantidad de energía, y el inyectar vapor directamente en el medio presenta las siguientes desventajas:

Destruye el medio de cultivo ( por las altas temperaturas de las burbujas).

Mezcla agua que viene directamente de las calderas, pudiendo introducir sustancias indeseables al medio.

Diluye el medio en un 20 %.

Se hicieron los cálculos siguiendo el método explicado en el apéndice III. Se obtuvieron siguientes resultados usando vapor por la camisa y agua de enfriamiento a 18°C:

Tabla 5

Ciclos de esterilización para el escenario I

	1	2	3	4	5	6
Temp(mant) ('C)	120	120	121	121	122	122
Temp(cal) ('C)	130	170	150	170	150	170
tiempo(cal)(seg)	1944	894	1219	911	1247	927
flujo(vap)(kg/s)	0.040	0.087	0.064	0.086	0.068	0.084
tiempo(mant)(seg)	868	1041	778	819	592	658
tiempo(enf)(seg)	2645	2069	2069	2069	2069	2069
flujo(agua)(kg/s)	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tiempo total(min)	91	67	68	63	51	61

Se prefieren los ciclos donde el vapor de calentamiento se usa a la temperatura de caldera, para evitar pérdidas de energía.

Esterilización de aire (filtración):

La esterilización de aire se realiza por medio de filtros de fibra de vidrio o membranas. Los resultados obtenidos en la tabla 6 fueron calculados por las ecuaciones y métodos del Apéndice III. Se tomó como criterio de esterilización un batch contaminado por cada 1000 y una concentración de microorganismos en el aire de 200 micro/ft<sup>3</sup>. En la tabla 6 se calculan las dimensiones de los filtros de fibra de vidrio y los requerimientos por cartuchos de membranas. Es preferible usar los filtros de

membrana porque presentan menor caída de presión y no presentan crecimiento interno de microorganismos. Los de fibra de vidrio pueden mojarse al pasar vapor y provocar que la estructura de malla se descomponga, causando crecimientos microbianos e incluso la perforación misma de la malla. Se usan los filtros de fibra de vidrio cuando no se puede contar con otros.

Tabla 6

Esterilización de aire para el escenario I

=====

a) Filtro fibra de vidrio (8 micrómetros,  $-\log(1-\mu)=17.6$ )

Diámetro tubo (cm)	10	7	6	5
Vel. aire (ft/min)	145	298	375	584
Dif. pres (psig)	15	4.6	4.1	2.5
Longitud (pulg)	105	18	10	3.5

b) Filtro de membrana EMFLON (PoliTetraFluoroEtileno)

Tamaño fibra	0.2 microm
Núm. cartuchos (10")	1
Caída presión (psig)	0.1
Flujo aire (ft <sup>3</sup> /min)	12.36

=====

III.D.1.c Concentración de células.

Para evitar pérdidas de actividad en el producto, es recomendable enfriar la corriente de proceso (44). Este enfriamiento también será útil para los pasos posteriores. Para lograr esto se utiliza un sistema de intercambio de calor por placas. El equipo es de un tamaño relativamente

pequeño comparado a un sistema de coraza y tubos. Para lograr reducir la temperatura hasta un valor aceptable, es decir, en el cuál se pueda evitar la inactivación de los péptidos, es recomendable el uso de un fluido refrigerante como una salmuera o una solución de etilenglicol. Supusimos una temperatura final de enfriamiento de 10°C.

TABLA 7

=====

Sistemas de enfriamiento de la corriente de proceso

-----

Flujo de refrigerante (Sol. Etilenglicol): 300 l/h

Area necesaria : 0.43 m<sup>2</sup>

Características del Intercambiador:

De Placas : 20 placas de 15x30 cm

De Coraza y tubos : 167 tubos de 1" diam y 10 ft de longitud.

=====

El sistema de placas es muy versátil y se puede utilizar en diferentes puntos del proceso.

Se necesita concentrar las células lo más posible. En la literatura se ha reportado que fácilmente se puede llegar a concentraciones de 250 g/l (44). Para ello se cuentan con varios métodos. Los sistemas que hasta ahora han dado resultado son la centrifugación (44, 6) y la ultrafiltración (65).

Según Higgins (44) para la capacidad del escenario I se puede lograr una concentración mediante una centrifuga de discos del tipo Westphalia SAMR 3036 con un volumen de retención de 3.9 l y un flujo de alimentación de 250 l/h . Debido a la naturaleza de E.Coli (peso y tamaño) la capacidad hidraulica de una centrifuga debe de ser 10 veces mayor a la capacidad de uso que se le vaya a dar para poder tener resultados satisfactorios.(7)

Con una capacidad hidráulica de 2500 l/h es válido suponer una eficiencia de separación de 95 % de acuerdo a los resultados de (44) y (6).

La energía utilizada en este equipo se puede aproximar de acuerdo con un factor reportado por Moo-young de 7.6 KW-h/1000 L de filtrado.

En el caso de utilizar ultrafiltración se ha reportado (65) que se ha podido lograr una eficiencia de 100%. Suponemos entonces una eficiencia de 99 %.

Uno de los equipos que se pueden adaptar a esta operación es el sistema de ultrafiltración Hollow-fiber de la marca Amicon tipo DC30P. Viene integrado por una bomba de desplazamiento positivo de velocidad variable (0-35 gpm) y con sistema de cartuchos intercambiables. Según datos de catálogo las mallas que se utilizan para E.Coli son del tipo MPO1-43 con un cutt-off de 0.1 micrómetros. El área de filtración de cada cartucho es de 0.49 m<sup>2</sup>. Utilizando tres cartuchos de este tipo se obtiene un flujo de filtrado de 150 L/h y se logra en dos horas (123 min). La energía

requerida se calcula con un factor reportado por Moo-Young que es de 1.6 KW-h/1000 l de filtrado.

Podemos comparar ambos sistemas :

Tabla 8

=====  
Centrifugación

Tipo : Centrifuga de discos Westphalia SAMR 3036 Hermética

Capacidad hidráulica : 2500 L/h

Eficiencia de separación : 95 %

Energía utilizada : 2.37 Kw-h/corrida

Tiempo utilizado : 1.25 hr

-----  
Ultrafiltración

Tipo : Sistema de ultrafiltración Amicon DC30P

Mallas : MPO1-43 (cut-off 0.1 micrómetro)

Area : 3 cartuchos a.d. 1.35 m<sup>2</sup>

Eficiencia de separación : 95 %

Energía utilizada : 0.5 KW-h/corrida

Tiempo utilizado : 2.05 hr

=====  
Escogimos la ultrafiltración por las siguientes razones: la eficiencia de separación para estos equipos es mayor que para los equipos de centrifugación y, cambiando las mallas, se puede utilizar el mismo equipo en diferentes partes del proceso. Esta es una elección preliminar y necesaria para evaluar el proyecto. La elección final debe

de ir acompañada de resultados experimentales a nivel planta piloto.

### III.D.1.d Homogeneización

Existen diferentes métodos de rompimiento celular que se utilizan en la industria. Los principales son el molino de bolas, Manton-Gaulin y fluidos supercríticos. El método de fluidos supercríticos es en el que se logra la mejor ruptura y no se pierde actividad en los productos (6). Sin embargo es demasiado caro para nuestros propósitos. De los otros dos métodos el que mejor ha funcionado con E.Coli recombinante es el Manton Gaulin. Han sido reportadas varias experiencias en la homogeneización de E.Coli en la obtención de un producto intracelular ( beta-galactosidasa, (64) y (44)).

Los resultados publicados por estos autores muestran que no es posible realizar un rompimiento adecuado en un solo paso, ya que únicamente se puede lograr hasta un 67 % utilizando un homogeneizador de alta presión Manton-Gaulin. Dicho aparato hace pasar la suspensión de células a través de un válvula de orificio, operando en un rango de presiones de 350-550 Kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 5°C.

Higgins encontró al comparar el rompimiento en una sola etapa y con reciclamiento en un aparato M.Gaulin (7) que al operar a una presión de 350 Kg/cm<sup>2</sup> y 550 Kg/cm<sup>2</sup> que la velocidad de rompimiento se reduce en el primer caso en un 40 % con respecto al segundo. Que la cantidad de beta-



galactosidasa liberada correspondiente a una cantidad de células lisadas era la misma y por último, que después de varios pasos de rompimiento la cantidad máxima de células que pudieron ser desintegradas fué un 85 % del valor original, mientras que el porcentaje de enzimas liberadas fué de casi un 95% con respecto al total, logrando esto en un tiempo aproximado de 40 minutos.

Por otro lado Hetherington (66) encontró que para dos tipos de homogeneizadores Manton-Gaulin modelos 15M-8BA y K3 con capacidades de 54 y 280 L/h respectivamente, la cinética de lisamiento fué idéntica. Brookman (61) ha reportado que no hay un efecto significativo en el rompimiento debido a la concentración de células en un rango de 28 a 224 g/L. Follows et. al. (62) encontraron que la actividad de una enzima liberada por levadura como proteína soluble no es afectada por la presión de rompimiento. Sin embargo, la velocidad de separación de la enzima varía para cada tipo. Las enzimas localizadas en la pared celular son más rápidamente liberadas, mientras que todas las que se encuentran en el citoplasma son liberadas a la misma velocidad y las partículas subcelulares son liberadas más lentamente.

La energía consumida en el rompimiento para un homogeneizador Manton-Gaulin de 280 L/h de capacidad con una eficiencia de rompimiento de 90% tiene un consumo de energía de 0.1678 Kw-hr/Kg de células alimentadas (66).

Una buena opción de rompimiento es utilizar un homogeneizador Manton-Gaulin del tipo 15M-8BA APV Co. y mediante un proceso de reciclado efectuar el rompimiento en varios pasos (no se recomienda más de 4) con una presión de operación de 550 Kgf/cm<sup>2</sup>. Debido a que no se conoce la velocidad de liberación de las proteínas híbridas, es necesario suponer que éstas quedan libres hasta el momento en que se logra el rompimiento de la célula. Por lo tanto, se logra una recuperación del 85 % y se tiene una inactivación del 5 %. Se debe utilizar un sistema de enfriamiento después de cada paso en el sistema de rompimiento; es posible utilizar el sistema mencionado anteriormente. El consumo de energía, basándonos en los resultados de Hetherington (66), es de 1.18 Kw-h.

Tabla 9

=====  
Características del equipo :

Tipo : Manton-Gaulin 15M-8BA APV Co.

Capacidad : 280 L/h

Presión de operación : 550 Kgf/cm<sup>2</sup>

Numero de pasos : 4 para ambos escenarios

Tiempo requerido : 1 hora

Eficiencia : 85% de rompimiento y 5% de pérdidas por  
inactivación

Energía utilizada : 1.18 KW-h  
=====

### III.D.1.e Clarificación y enriquecimiento :

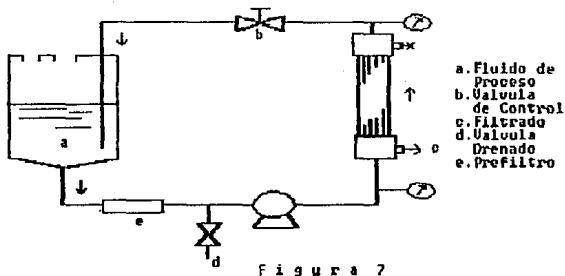
Se puede clarificar mediante centrifugación y ultrafiltración.

La centrifugación se lleva a cabo en dos corridas, a dos velocidades diferentes, una para colectar la fase menos pesada y otra para colectar la más pesada (enriquecida).

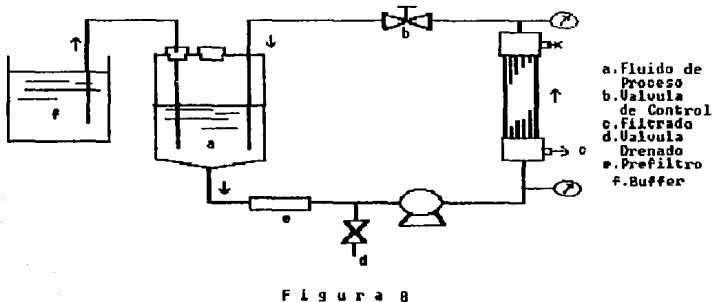
En el caso de ultrafiltración, es necesario primero clarificar el medio. Para clarificar primero se reduce el volumen concentrando (250 g/l) y luego se lava con agua pura (4 veces el volumen original). Esto puede hacerse con la misma malla que se usó para el proceso de concentración de células. Debemos recolectar el filtrado, aunque éste está diluido y es preciso concentrarlo. La segunda operación consiste en concentrar la proteína híbrida en el mismo aparato pero con una malla diferente (Cut-Off 10000). Las dos configuraciones para ultrafiltración y microfiltración se presentan en las figuras 7 y 8.

Podemos utilizar el equipo Amicon DC30P (el mismo utilizado anteriormente). Se utilizan dos tipos de fibras del tipo MP01-43 (cut-off 0.1 micrómetro) y la P100-43 (cut-off de 100000 MW). Trabajando con un sistema de tres cartuchos se tendrá una velocidad de filtrado de 120 o de 150 L/h. Por tanto la remoción tomará alrededor de 0.33 hrs (20 min) o 0.27 (16 min). El consumo de energía es de 0.07 Kw-hr/corrida (6).

## Concentración



## Diafiltración



Sistema de Micro y Ultrafiltración con mallas tipo Hollow Fiber

Tabla 10

Clarificación utilizando Ultrafiltración  
en el Escenario I

Equipo	Amicon DC30P
Area	1.35 m <sup>2</sup>
Flujo de filtrado	120-150 lt/h
Tiempo de preconcentración	0.09-0.11 h
Tiempo de lavado	0.92-0.73 h
Energía utilizada por corrida	0.07 Kw-h

Después de eliminar las células lisadas la concentración de proteínas híbridas es de 6.8 g/l. Se concentra por ultrafiltración debido a su mayor eficiencia.

Se ha reportado que en productos como la insulina, enzimas, anticuerpos, antígenos, y hormona de crecimiento la eficiencia de recuperación es muy alta (en algunos casos hasta un 99 %) (68) y (70).

Podemos volver a utilizar los mismos sistemas que en los pasos anteriores. Se utilizan mallas tipo P10-20 (cutt-off 10000 MW) Amicon. Con tres cartuchos, el equipo DC30P puede lograr un flujo de filtrado de 90 L/h. Se llega hasta una concentración de 180 g/l.

Tabla 11

-----  
 Concentración de proteínas híbridas  
 utilizando ultrafiltración para el escenario I  
 -----

Equipo	DC30P
Malla	P10-Amicon Cutt-off 10000 MW
Flujo de filtrado	90 L/h
Eficiencia	95 %
Tiempo	0.4 h
Energía utilizada por corrida	0.06 Kw-h

-----

#### III.D.1.f Cianogenólisis

La cianogenólisis tiene como objetivo separar la cadena respectiva de la proteína híbrida. Debido a que en la literatura no existen datos específicos sobre la reacción, tales como la cinética y la estequiometría, y por lo tanto en este estudio se escaló de acuerdo a los datos provenientes del grupo de laboratorio. La reacción se lleva a cabo disolviendo la proteína en ácido fórmico al 70 % y después se agrega el bromuro de cianógeno.

Una desventaja importante es que uno de los productos secundarios es la formación de ácido cianhídrico el cual, de ninguna manera, podrá ser arrojado a la atmósfera. Es necesario adaptar al reactor un sistema de retención de gases que puede ser una trampa de cal sodada en la cual el

gas venenoso será retenido en forma de sal. Este sistema ha sido utilizado en el laboratorio y ha dado buenos resultados. También es recomendable que todos los pasos subsecuentes se hagan en el mismo lugar para reducir los riesgos de exposición por el traslado. Una cosa que podría funcionar es tener un tanque de reacción en el cual se lleve a cabo la evaporación del ácido fórmico y la reacción de sulfitólisis.

Tabla 12

-----  
Sistema de Cianogenólisis

Escenario I  
-----

Volumen	
de reacción	10.4 L
Temperatura	Ambiente
Presión	Atmosférica
Tiempo	12 - 15 hrs
Conversión	90 %

-----  
De acuerdo a las condiciones anteriores se puede proponer el uso de un reactor tipo Batch con las siguientes características :



Tabla 13

-----  
 Reactor para la Cianogenólisis  
 Escenario I  
 -----

Volumen	
nominal	15 L
Diámetro	0.25 m
H/D	1
Altura nom	0.41 m
Baffles	4/0.025 m
Impulsores	1
Tipo	Turbina 6 aspas planas
Material	Acero Inoxidable 316
Agitación	300 rpm
Capacidad Motor(70%ef)	1/4 Hp
Energía consumida	0.0006 Hp

-----

III.D.1.g Sulfitólisis

La falta de información sobre esta reacción dificulta nuevas propuestas. Hirs (53) menciona que la conversión de la reacción es alta aunque debe variar para cada péptido. Se tomarán los datos de laboratorio para el diseño del sistema de reacción.

Antes de efectuar la reacción es necesario eliminar el ácido fórmico proveniente de la cianogenólisis con el fin de

resuspender en el disolvente adecuado para la sulfitolisis. La evaporación debe llevarse acabo a una tempertura menor de 35 'C.

Se eliminará casi en su totalidad el solvante (hasta un 95 %, ácido fórmico al 70 %) que fué adicionado en la cianogenólisis. Finalmente, se obtendrá una pasta que se lavará varias veces con agua.

Se evapora el ácido, con un sistema de evaporación Batch (Rotavapor), en un tiempo menor de una hora. Una de las ventajas en el uso de éste sistema es que cuenta con un sistema de vacio integrado. Se opera a una presión de 54-69 mmHg (30-35 'C), como lo indica la figura 9. Es importante adaptar a este aparato un sistema de retención para el ácido cianhidrico similar al utilizado en el reactor de cianogenolisis. Se puede usar un reactor de acero inoxidable que tenga adpatado un sistema de condensación y calentamiento, asi como un sistema para hacer vacio, para lograr la evaporación.

# Presión de vapor vs. Temperatura sistema de cianogénesis

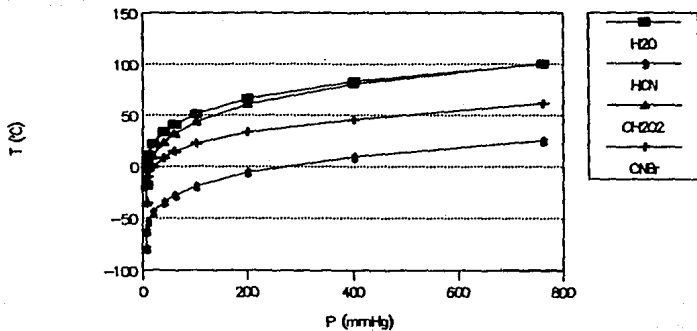


Figura 9

En esta operación se debe considerar un porcentaje de pérdida de actividad de la molécula, y debido a que no se ha cuantificado, ni existe ningún valor reportado, se supondrá una inactivación del 5 %.

Después de haber eliminado el ácido fórmico es necesario disolver las cadenas en una solución de cloruro de guanidinio 8 M. Se debe disolver en una proporción de 66 ml por gramo de cadena. La sulfitólisis se lleva a cabo considerando las siguientes condiciones:

Tabla 14

-----  
Sistema de Sulfitólisis

Escenario I  
-----

Volumen de reacción	8.91 L
Temperatura	Ambiente
Presión	Atmosférica
Tiempo	12 - 15 hrs
Conversión	99 %
Observaciones:	Se requiere ausencia de luz

-----

Los volúmenes y las condiciones de temperatura y presión de la reacción son similares a las de la cianogenolisis. Se propone el uso del mismo reactor para llevar a cabo las dos reacciones. Las principales ventajas del uso de este reactor son: el ahorro en la inversión y que debido a la toxicidad del ácido cianhídrico formado en la cianogenolisis es conveniente no manejar la mezcla de péptidos hasta después de realizar las dos reacciones.

#### III.D.1.h Diafiltración:

Se llevará a cabo la diafiltración mediante un sistema de ultrafiltración. Para lograr un menor tiempo en esta operación y una mayor eficiencia se propone un paso previo de concentración similar al utilizado para filtrar los restos celulares. La forma en que operan estos sistemas se muestra en las figuras 7 y 8. Como se aprecia, es necesario agregar un medio libre de iones el cual irá reemplazando al líquido que se llevará a los iones. El medio libre de iones será una solución de agua desionizada. La eficiencia de esta separación esta en función de la relación del volumen final al volumen inicial, y se ve regida por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = 1 - \text{EXP}(-VF/V0) *$$

\* Catálogo Amicon.

Originalmente, se liofilizaba después de desalar para concentrar y resuspender en urea, se filtraba y finalmente se purificaba por HPLC. Al proponer la diafiltración y

concentración con solubilización posterior en urea 3 M, nos ahorramos el paso de liofilización. Es preferible hacer una preconcentración, como en el caso de la clarificación, para lograr una mejor eficiencia en el proceso.

Si concentramos hasta 250 g/l, suponemos un Volumen inicial de 1 (V0), y nos basamos solamente en la eliminación del cloruro de guanidinio, (se tienen 3 moles iniciales o 764 g (PM=95.5)), podemos construir la siguiente tabla :

Tabla 15

VF	Ef(%)	g Cloruro finales	Conc.final (M)
1.0	63.2	281.5	2.94
2.0	86.5	103.1	0.54
3.0	95.0	38.0	0.13
4.0	98.2	13.8	0.036
4.5	99.0	8.5	0.0197
5.0	99.3	5.1	0.0107

(V0=3.0 para E-I)

En (41) se fija 3.5 milimhos como medida de concentración después de la diálisis. Esto equivale aproximadamente a 0.026 M queriendo decir con esto que con un volumen final 4.5 veces mayor al inicial se alcanza la concentración de sales requerida a nivel laboratorio. Es necesario aclarar que la concentración máxima permisible de sales en HPLC se tendrá que determinar experimentalmente.

El sistema Amicon DC30P puede utilizarse con relativa facilidad adaptando tres cartuchos de una malla Cut-Off 1000 hechos de fibra HSP1-43. El equipo opera en las siguientes condiciones:

Tabla 16

Diafiltración utilizando ultrafiltración, Escenario I	
Equipo	DC30P
Malla	P10-Amicon Cutt-off 1000 MW
Flujo de filtrado	15 L/h
Eficiencia	99 %
Tiempo preconcentración	0.42 h
Tiempo lavado	1.37 h
Energía	0.085 Kw-h

Un paso ,previo a la diafiltración, que se hace para evitar mayores perdidas en la actividad del producto, es enfriar la corriente. Se utiliza el sistema de refrigeración que se mencionó con anterioridad.

#### III.D.1.i Cromatografía Líquida de Alta Presión:

En el sistema de HPLC se tiene una eficiencia aproximada de 99 %.

Este sistema se opera de la misma manera que a nivel laboratorio. Esta técnica fué utilizada por (55), en la cual se obtuvieron resultados ampliamente satisfactorios. Existen



actualmente sistemas cromatográficos en los cuales es posible manejar volúmenes industriales (6). Sin embargo, hay que escalar los resultados obtenidos en el laboratorio y hacer la experimentación debida para alcanzar mayores flujos.

Con los datos de laboratorio podemos escalar suponiendo que quedan fijos: la relación de las dimensiones de la columna (longitud/diámetro), el número de Reynolds y los gramos de material por area por kilogramo de empaque (6). En estas condiciones las dos columnas tienen condiciones de operación similares. No podemos suponer otras condiciones porque estas tendrían que conocerse por experimentación. Para la columna chica  $L/D = 12.5$ , Flujo = 2.5 ml/min. Para la columna grande (PrePLC 500A), Vol=300 ml, suponiendo  $Re$  y  $gmat/area/Kg$  empaque iguales, El flujo de la columna grande será de 9.79 ml/min. Los tiempos de retención reportados por Ladrón de Guevara (55) son los siguientes: para cadena A 7.6 min y para Cadena B 9.9 min. El volumen final, si se recoge el pico cromatográfico donde se encuentra la cadena en un tiempo promedio de 1.5 min es de 0.625 l y la concentración final es de 195 g/l. El sistema retiene 60 g de proteína por corrida por columna (300 ml), si ponemos dos columnas seguidas captará 250 g de proteína. El tiempo aproximado por cada corrida es de 60 min. Se pueden realizar muchas corridas para lograr la separación o tener más columnas o más aparatos cromatográficos, esto se decidirá posteriormente.

### III.D.1.j Liofilización:

La liofilización es utilizada comúnmente en la industria farmacéutica, su principal ventaja es que se puede lograr un secado con una alta eficiencia (hasta un 1% de humedad residual). El secado se logra mediante la sublimación del disolvente. Se requieren temperaturas entre -50 y -60°C y presiones de alto vacío ( $5 \times 10^{-2}$  torr).

Los productos biológicos liofilizados pueden conservarse largo tiempo, incluso a temperatura ambiente, deteniéndose toda actividad biológica. Las soluciones originales se regeneran totalmente al añadir agua. Las cadenas se pueden almacenar por largo tiempo sin que sufran ningún daño (aproximadamente 6 meses para cadena B y 3 meses para cadena A). (63).

### III.D.1.k Asociación de cadenas A y B:

La reacción de asociación de péptidos es muy poco conocida, por lo que los datos obtenidos en el laboratorio no pueden ser comparados. Es por ello que el diseño de las condiciones de reacción se hizo escalando estos datos. La eficiencia y la estequiometría en la reacción son las siguientes:

2 gramos de A + 1 gramo de B ---> 0.6 gramos insulina

Las condiciones se presentan a continuación:

Tabla 17.

-----  
 Sistema de Asociación

Escenario I  
 -----

Volumen	
de reacción	45 lts*
Temperatura	Ambiente
Presión	Atmosférica
Tiempo	18 - 22 hrs
Conversión	60 % (cadena-B)

-----  
 \* Se realizarán 4 reacciones al año.

La operación se realiza con la misma técnica descrita en la primera sección de este capítulo, ref (60). De acuerdo con los datos de la tabla anterior se propone el reactor con las siguientes características:

Tabla 18

-----  
 Reactor para la Asociación  
 Escenario I  
 -----

Volumen	
nominal	70 L
Diámetro	0.38 m
H/D	1
Baffles	cuatro/0.048 m espesor
Impulsores	2
Tipo	Turbina 6 aspas planas
Material	Acero Inoxidable 316, enchaquetado
Agitación	100 rpm
Capacidad Motor(70%)	1/4 Hp
Energía consumida	0.006
Flujo de refrigerante*	2 kg/s
Tiempo para enfriar	6.2 min

-----  
 \* El fluido refrigerante es etilenglicol (10%), el flujo es el necesario para enfriar y mantener el reactor a 5°C, sin calor de reacción y con pérdida de calor por disipación a través de la pared del tanque.

Por último, es importante mencionar que se pueden proponer y diseñar sistemas alternos para los reactores, como serian reactores con reflujo y separación por HPLC.

Todos los pasos posteriores a la reacción también tendrán que considerar sistemas de refrigeración para el manejo de la insulina.

#### III.D.1.1 Purificación y cristalización:

El sistema de purificación para la insulina es el mismo que para la purificación de la cadena B. También se propone un sistema alternativo de intercambio iónico. Este sería más útil porque el producto final no estaría expuesto a solventes orgánicos, la recuperación de la bioactividad es muy buena, la capacidad es muy alta y la resolución es excelente. (58)

Si se utiliza un sistema de fase inversa se tiene que evaporar el eluyente; si se utiliza intercambio iónico se tiene que diafiltrar nuevamente el purificado. El desalado se haría en el sistema descrito con anterioridad (con malla 5000), con una eficiencia del 98.2%, un flujo de 80 l/h, en un tiempo de 5 minutos.

La cristalización debe de efectuarse en forma lenta con las condiciones establecidas con anterioridad (57). Para lograr llevar acabo esta operación proponemos el uso de un tanque cristizador con sistema de refrigeración, en el cual la cristalización se realizará únicamente dejando la mezcla reposar durante un periodo determinado. Es conveniente sugerir un método de evaporación semi-forzada pero sin el uso de calor, empleando una corriente de aire. El cristizador tendría una capacidad aproximada entre 15 y

25 litros.

Por último, podemos liofilizar la insulina en los frascos en los cuales van a ser transportados. Resuspendiéndola en una solución de agua ultra pura.

### III.D.1.m Equipo auxiliar

#### Tanques:

##### Agitados (motor 1/4 Hp):

1 tanque ac.inox.	500 lts
1 " "	250 lts
1 " "	80 lts
2 tanques "	12 lts

##### No agitados :

1 tanque ac.inox.	250 lts
1 " "	80 lts
1 " "	70 lts
2 " "	60 lts

#### Bombas:

10 de 1/4 Hp

1 de 8 Hp

(en el caso de sistema de centrifugas se usan 2 bombas más de 1/4 Hp

### III.D.1.n Acondicionamiento a la planta del CIIGB.

El proyecto de producir insulina humana para llevar a cabo las pruebas clínicas, podría realizarse perfectamente en el centro en su estado actual. Se tendría que comprar equipo extra para completar el proceso. Se consultó directamente en el centro y se obtuvo un inventario de los

equipos y servicios con se que cuenta. De un análisis comparativo se reportan las siguientes necesidades para llevar acabo el proceso:

2 Sistemas de filtración Amicon DC30P

Reactor para Cianogenólisis-Sulfitólisis (vidriado) 15 L

Reactor para Asociación (70 L)

2 Cristalizadores (25 y 1 L)

1 intercambiador de placas

Tanques:

1 de 500 L agitado

2 de 250 L (uno agitado y uno no)

3 de 80 L (uno agitado y dos no)

2 de 60 L (no agitados)

2 de 15 L (agitados)



**Bombas:**

10 de 1/4 Hp

1 de 2 Hp (en el caso de sistema de  
centrifugas se usan 2 bombas más de 1/4 Hp

Un análisis detallado de las necesidades, así como un inventario exhaustivo de la infraestructura, se tendrá que llevar a cabo para poder conocer con exactitud la situación actual del centro. El análisis, aunque no exhaustivo, revela las necesidades principales en inversión de equipos que serán suficientes para el análisis económico posterior.

**III.D.2 Análisis técnico para el escenario II.**

**III.D.2.a Preparación del inoculo**

Para el escenario II se siguieron los mismos pasos de cálculo y las mismas suposiciones que para el escenario I. En este caso se utilizará, para llegar a tener el inóculo de los dos tanques de 2800 lts., dos tanques de volumen de operación de 1 lt, dos tanques de 10 lts, y dos tanques de 350 lts ( $D_t=0.6$  m,  $A_{int}= 2.4195$  m<sup>2</sup>,  $H/D=2$ ,  $D_i/D_t = 1/3$ ). De estos últimos la concentración del inóculo será de 0.57 g/l, el tiempo muerto de 3 horas, el tiempo de fase lag de 1.2 horas, el tiempo de fermentación de 12 horas y la productividad de 1.24 g/l-h.

A continuación se presentan las características de la fermentación para el escenario II :

$X_0=2.5$  g/l,  $X_f=20$  g/l,  $t_0=4$ h,  $t_{lag}=2$ h,  $t=6.93$ h,

$P=1.5383$  g/l-h

### III.D.2.b Fermentación

Dimensiones del fermentador.

Para el escenario II se diseñaron fermentadores para diferentes configuraciones, suponiendo tapas toriesféricas y un volumen de trabajo del 70% con las siguientes ecuaciones:

$Vol=V_{cil} + V_{tapas}$ ,  $Vol= H*PI/4*D^2 + 0.089*D^3$ ,  $A= A_{cil} + A_{tapa}$ , suponiendo  $h=D/6$ , entonces  $A=H*PI*D + PI/6*D^2$ , donde H puede ser D, 2D, o 3D.

A continuación se presentan para distintas relaciones de altura-diametro el area y diámetro del fermentador.

Tabla 20

	Relación H/D		
	1	2	3
Diámetro(m)	1.4785	1.1924	1.0474
Area(m <sup>2</sup> )	8.0120	9.6780	10.9138

Calor generado :

Se generará aproximadamente 57,300 kcal/h y se necesitará un flujo de agua de 3000 Kg/h que saldrá a 30 °C. Se necesitará también de un serpentín con 5.17 o 10.37 vueltas dependiendo del diámetro del tubo. (de 1 o de 1/2 pulgadas).

Potencia y aireación :

Para conocer las características de agitación y aireación del fermentador lo que se hizo fue escalar con el mismo valor de P/V obtenido del fermentador de 350 L. Para ello se utilizó el método expuesto en el apéndice II. A continuación se presentan las características del fermentador:

Tabla 21

Características para el fermentador del escenario II	
Vol nom	4000 lts
Vol trabajo	2800 lts
Num.turbinas	2(6 aspas planas)
Dtanque	1.1924 m
Dimpulsor	0.3975 m
H(altura liq.)	2.385m
Htotal	3.58m
Material tanque	Acero inoxidable (316)
4 Baffles	0.12m ancho
P aireada	2.7 Hp
P/V	777.685 W/m3
Flujo aire	2.43e-2 m3/s(0.52 vvm)
Pg/Po	0.39
RPM	205
Capacidad motor (70%ef)	10 Hp

Medio de cultivo e induccion :

El medio de cultivo y el sistema de inducción serán los mismos que se utilizaron en el caso del escenario I.

Esterilizacion del medio de cultivo :

Se contará con una caldera de 500 CV, 650 kg/h, para cada fermentador. El criterio de diseño delta es de -33.5. Se obtuvieron los resultados de la tablas 22.

Tabla 22

Ciclos de esterilización para el escenario II

	1	2	3	4	5	6
Temp(mant) ('C)	120	120	121	121	122	122
Temp(cal) ('C)	150	170	150	170	150	170
tiempo(cal)(seg)	1925	1444	1417	2014	1497	1969
flujo(vap) (kg/s)	0.324	0.432	0.424	0.310	0.417	0.317
tiempo(mant) (seg)	1021	1073	847	576	800	777
tiempo(enf) (seg)	2443	2443	2443	2443	2443	2443
flujo(agua) (kg/s)	10	10	10	10	10	10
Tiempo total(min)	89	83	79	84	79	87

Esterilización de aire :

Conforme a los cálculos del apéndice III se obtuvieron los resultados expresados en la tabla 23.

Tabla 23

Esterilización de aire para el escenario II

=====

Filtro de membrana EMFLON (PoliTetraFluoroEtileno)

Tamaño fibra	0.2 microm
Núm. cartuchos (10")	2
Caída presión (psig)	0.35
Flujo aire (ft <sup>3</sup> /min)	49

=====

III.D.2.c Concentración de células

A continuación se comparan dos opciones de concentración de células.

En el caso de centrifugación ha sido reportado (6) que se puede lograr un separación con una eficiencia de un 95 % utilizando una centrifuga Alfa-Laval de la serie AX213 hermética, cuyo flujo de filtrado es de 5000 L/h. La capacidad dependerá del tiempo y del número de equipos que se consideren. La elección de esta capacidad se encuentra supeditada principalmente al costo, ya que entre mayor sea la capacidad, menor será el tiempo de operación pero mayores son los costos. De cualquier modo, la energía consumida durante esta operación será aproximadamente de 33.6 KW-h. Esta comparación se podrá observar más adelante.

En el caso de ultrafiltración la separación se puede lograr mediante el sistema Amicon DC120P que cuenta con un sistema de bombeo de velocidad variable (0-120 gpm) y

desplazamiento positivo. Se deberá usar el mismo tipo de fibra que se utilizó en el escenario I. El sistema cuenta con cartuchos intercambiables, cada uno con un área de alrededor de 2.8 m<sup>2</sup> (área total = 11.2 m<sup>2</sup>). Al utilizar cuatro de estos cartuchos se podrá obtener un flujo de filtrado de 600 L/h. Por este motivo, la separación no se podrá llevar a cabo en un tiempo menor a 8 hrs. La energía consumida es de 6.76 KW-hr.

Se presenta a continuación una tabla comparativa entre los dos sistemas:

Tabla 24

Equipo	Centrifuga Alfa-Laval Serie AX213	Ultrafiltro Amicon Tipo DC120P
Capacidad	6300-50000 L/h	11.2 m <sup>2</sup>
Tiempo requerido	1-8 hrs	8 hrs
Energía Utilizada	33.6 KW-hr	6.76 KW-hr

#### III.D.2.d Homogeinización

Se puede utilizar el mismo equipo propuesto para el escenario I. El tiempo de proceso es aproximadamente una hora y se necesitará de 18.88 KW-h.

#### III.D.2.e Clarificación y enriquecimiento

El sistema que puede ser utilizado es el DC120P Las fibras para este caso son: MP01-43 y P100-43 .El flujo de filtrado que se puede obtener en este aparato es de 480 L/h y 600 L/h respectivamente .La eficiencia es de 95 %. Por lo tanto, el tiempo de proceso será de 1.2 hr (72 min) y 0.96 hr (58 min) .El consumo de energía será de 1 KW-h/corrida.

Tabla 25

-----  
 Clarificación utilizando Ultrafiltración  
 para el escenario II

Equipo	Amicon DC120P
Area	11.2 m <sup>2</sup>
Flujo de filtrado	480-600L/h
Tiempo de preconcentración	1.85-1.47 h
Tiempo de lavado	14.7-11.76 h
Energia utilizada por corrida	1 Kw-h

-----



Tabla 26

=====

**Concentración de proteínas híbridas  
utilizando ultrafiltración para el escenario II**

-----

Equipo	DC120P
Malla	P10-Amicon Cutt-off 10000 MW
Flujo de filtrado	350 L/h
Eficiencia de separación	95 %
Tiempo utilizado por corrida	1.5 h
Energía utilizada por corrida	0.84 Kw-h

=====

III.D.2.f Cianogenolisis :

Tabla 27

=====

**Sistema de Cianogenólisis  
para el caso del escenario II**

-----

Volumen de reacción	166 L
Temperatura	Ambiente
Presión	Atmosférica
Tiempo	12 - 15 hrs
Conversión	90 %

=====

De acuerdo a las condiciones anteriores se puede proponer el uso de un reactor tipo Batch con las siguientes características :

Tabla 28

-----  
 Reactor para la Cianogenólisis  
 en el caso del escenario II  
 -----

Volumen nominal	250 L
Diámetro	0.48 m
H/D	2
Altura nom	1.37 m
Baffles	4/0.048 m
Impulsores	2
Tipo	Turbina 6 aspas planas
Material	Acero Inoxidable 316
Agitación	100 rpm
Capacidad Motor(70%ef)	1/4 Hp
Energía consumida	0.006 Hp

-----

### III.D.2.g Sulfitólisis

Para eliminar el ácido fórmico se propone un sistema de evaporación por lotes. Hay varias opciones: operar el mismo sistema del Escenario I en varios pasos, tener un sistema de evaporación de mayor capacidad acoplado a un sistema de vacío o evaporar en el mismo reactor . La evaporación podrá

efectuarse en un tiempo de 4 horas. La presión de operación es la misma que la requerida en el Escenario I y también deberá utilizarse la trampa de cal sodada.

Las condiciones de reacción para la sulfitólisis son las mismas que las utilizadas en el escenario I.

Las características del reactor para este escenario II son :

Tabla 29

-----  
Características del reactor para la Sulfitólisis  
en el caso del escenario II  
-----

Volumen de reacción	148 L
Temperatura	Ambiente
Presión	Atmosférica
Tiempo	12 - 15 hrs
Conversión	99 %
Observaciones	Ausencia de luz

-----

### III.D.2.h Diafiltración

Tabla 30

-----  
Diafiltración utilizando ultrafiltración  
para el caso del escenario II  
-----

Equipo	DC120P
Malla	P10-Amicon Cutt-off 1000 MW
Flujo de filtrado	60 L/h
Eficiencia	99 %
Tiempo preconcentración	6.67 h
Tiempo de lavado	22.0 h
Energía consumida por lote	1.24 Kw-h

-----  
Se utiliza el sistema con 4 cartuchos Malla Cut-Off 1000,  
tipo H5P1-43.

Como se observa en el caso del escenario II el tiempo se vuelve muy grande, por lo que es necesario buscar alternativas con las cuáles se pueda lograr una misma eficiencia en la desalación. Una opción que puede analizarse es un sistema de intercambio iónico. Sin embargo en este estudio, debido a que no se han medido propiedades para estos péptidos, resulta casi imposible tratar de diseñar un sistema de este tipo. Es previsible que la efectividad será comparable a un sistema de diafiltración.

### III.D.2.i Cromatografía líquida de alta presión

Se propone utilizar el mismo sistema que para el escenario I.

### III.D.2.j Liofilización

Se utilizan las mismas condiciones que en el escenario I.

### III.D.2.k Sistemas de asociación

Tabla 31

-----  
Sistema de Asociación

Escenario II

-----

Volumen	
de reacción	494 lts**
Temperatura	Ambiente
Presión	Atmosférica
Tiempo	18 - 22 hrs
Conversión	60 % (cadena B)

-----

\*\* Se realizarán 8 reacciones al año.

Tabla 32

Reactor para la Asociación

Escenario II

Volumen	
nominal	700 L
Diámetro	0.68 m
H/D	2
Baffles	cuatro/0.048 m espesor
Impulsores	2
Tipo	Turbina 6 aspas planas
Material	Acero Inoxidable 316, enchaquetado
Agitación	75 rpm
Capacidad Motor	1/4 Hp
Energía consumida	0.07 Hp
Flujo de refrigerante*	8 kg/s
Tiempo de enfriamiento	12 min

\* El fluido refrigerante es etilenglicol (10%), el flujo es el necesario para enfriar y mantener el reactor a 5°C, sin calor de reacción y con pérdida de calor por disipación a través de la pared del tanque.

### III.D.2.1 Purificación y cristalización

Se purifica con un sistema de HPLC de intercambio iónico. Después se diafiltra con un sistema Amicon con malla 5000, con una eficiencia de 98.2%, un flujo de 80 l/h y en un tiempo de 14 minutos. Posteriormente se cristaliza y se liofiliza la insulina. El cristalizador podría tener las siguientes dimensiones:

Tabla 33

Tanque de cristalización	
Escenario II	
-----	
Volumen	
nominal	250 L
Diámetro	0.48 m
H/D	2
Altura nom	1.37 m
Material	Acero Inoxidable 316, enchaquetado
-----	

### III.D.2.m Equipo Auxiliar

#### Tanques:

Agitados (motor 1/4 Hp):

1 tanque ac.inox.	3300 lts
1 " "	2000 lts
1 " "	1100 lts
2 tanques "	180 lts

No agitados :

1	tanque ac.inox.	2000	lts
1	"	"	1100 lts
1	"	"	1000 lts
2	"	"	830 lts

Bombas:

10 de 1/2 Hp

1 de 8 Hp

(en el caso de sistema de centrifugas se usan 2 bombas más de 1/2 Hp).



### III.E Bibliografía:

- (1) Bailey, J.E. y D.F.Ollis. Biochemical Engineering Fundamentals 2a.ed., Singapur, McGraw-Hill International Editions, 1986, 984p.
- (2) Atkinson, B y F.Mavituna. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, Nueva York, The Nature Press, 1983, 1119 p.
- (3) Wang, D.I.C. et.al. Fermentation and Enzyme Technology, Nueva York, John Wiley & Sons, 1979.
- (4) Quintero, R. Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones, México, Alhambra-Mexicana, 1987.
- (5) Aiba, S., Humphrey, A.E. y N.F.Millis Biochemical Engineering, 2a.ed., Tokyo, University of Tokyo Press, Tokyo, 1973.
- (6) Moo-Young, Comprehensive Biotechnology Volumen 2 1a.ed., New York, Pergamon Press, 1985.
- (7) Demain, A.L. y N.A.Solomon Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Washington (D.C.), American Society of Microbiology, 1986, 466p.
- (8) Práve, P. et.al. Basic Biotechnology. A student's guide, Weinheim (Alemania), VCH Publishers, 1987
- (9) Galindo, E. "Desarrollo de metodologías que permitan el escalamiento a nivel de planta piloto de la obtención y aislamiento de intermediarios para la producción de insulina humana." Tesis de maestría en investigación biomédica básica, IIB-UNAM, 1983.
- (10) Informe sobre el estado del proyecto Insulina, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Agosto 1988.
- (11) Perry, R.H., y D.Green Perry's Chemical Engineers' Handbook Sixth Edition, Singapur, McGraw-Hill, 1984. (International Student's Edition)
- (12) Treybal, R.E. Transferencia de masa, 2a.ed., Trad. Aurelia García, México, McGraw-Hill, 1986, 858 p.
- (13) Kern, D.O. Procesos de transferencia de calor, México, Compañía Editorial Continental, 1986.
- (14) Foust, A.S., et.al. Principios de operaciones unitarias, Trad. Dr.J.A. Lanuza, México, Compañía Editorial Mexicana, 1985, 704 p.

- (15) Lehninger, A.L., Biochemistry, 2a. ed., Nueva York, Worth Publishers., 1975.
- (16) Burden, R.L. y J.D. Faires, Análisis Numérico, México, Grupo Editorial Iberoamérica, 1985, 721 p.
- (17) Tablas de Vapor, México, Representaciones y Servicios de Ingeniería, S.A., 1970, 146 p.
- (18) Anderson DaSilva, N. y J.E. Bailey "Theoretical growth yield estimates for recombinant cells", Biotechnology and Bioengineering, (Communications to the Editor), Vol. XXVIII, p. 741-746 (1986)
- (19) Andrews, G. "Estimating cell and product yields" Biotechnology and Bioengineering, Vol XXXIII, p 256-265 (1989)
- (20) Peretti, S.W. y J.E. Bailey "Mechanistically detailed model of cellular metabolism for glucose-limited growth of Escherichia Coli B/r-A", Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVIII, p. 741-746, (1986)
- (21) Dwivedi, C.P., J. Imanaka y S. Aiba. "Instability of plasmid-harboring strain of E. Coli in continuous culture.", Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV, p. 1465-1468 (1982)
- (22) Brauer, H. "Power consumption in aerated stirred tank reactor systems", Advances in Biochemical Engineering, Vol. 13, p. 87-118.
- (23) Oldshue, J.Y. "Fermentation symposium: fluid mixing" Advances in Applied Microbiology, Vol. 2, p. 278-283.
- (24) Griot, M. et al. "Fermenter scale-up using an oxygen-sensitive culture" Chemical Engineering Science, Vol. 43, Num. 8, p. 1903-1908, (1988)
- (25) Bader, F.G. "Modelling mass-transfer and agitator performance in multiturbine fermentators" Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXX, p. 37-51 (1987)
- (26) Mooyman, J.G. "Scaling oxygen mass-transfer in agitated fermentators", Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIX, p. 180-186 (1987)

- (27) Onuma, M., et.al. "Diffusion coefficient and its dependency on some biochemical factors", Biotechnology and Bioengineering, Vol.XXVII, p.1533-1539 (1985)
- (28) B.J.Mitchell y S.A. Miller, "Power requirements of gas-liquid agitated systems", AIChE Journal, Mayo 1962, Vol.8,Num.2, p 262.
- (29) Maxon, W.D. y Elmer L.G.Jr., "Fibrous filter for air sterilization ,Experimental studies with a pilot scale filter ", Industrial and Engineering Chemistry , Vol.48, No.12, pp 2177-2179 December 1956.
- (30) Garden, E.M. y A.E.Humphrey. "Fibrous filters for air sterilization; Design Procedures", Industrial and Engineering Chemistry, Vol.48, Num.12, p.2172-2176 (1956)
- (31) Humphrey, E.L. "Fermentation Symposiums: Air Sterilization", Advances in Applied Microbiology, Vol.2, p. 301-311
- (32) Conway, R.S. "State of the Art in Fermentation Air Filtration", Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVI p.844-847 (1984)
- (33) Leahy, T.J. y R.Gabler, "Sterile Filtration of gases by Membrane Filters", Biotechnology and Bioengineering, Vol.XXVI, p.836-843 (1984)
- (34) Shucosky, A.C. "Select the right Cartridge Filter" Chemical Engineering, 18 Enero, 1968
- (35) Aiba, S. y M.Okabe "A Complementary Approach to Scale-Up. Simulation and Optimization of Microbial Process", Advances in Biochemical Engineering Vol. 7, p.111-130
- (36) Kempe, L.L. "Sterilization of Media for Biochemical Processes", Advances in Microbiology, Vol.2, p.313-319
- (37) Singh, V., et.al. "Optimization of Batch Fermentator Sterilization", Biotechnology and Bioengineering, VolXXXIII, p.584-591 (1989)
- (38) Ashley, M.H.J. y J.G. Mooyman "Design Optimization of Continuous Sterilizers", Biotechnology and Bioengineering, Vol.XXIV, p.1547-1553 (1982)

- (39) Levenspiel, O. "Longitudinal Mixing of Fluids Flowing in Circular Pipes", Industrial and Engineering Chemistry, Vol.50, Num.3, Marzo 1958, p.343-346
- (40) Zheping, X. "Recovery of Bioproducts in China: A General Review", Advances in Applied Microbiology, Vol.33, p.319-355 (1988)
- (41) Estrada, G., Gárateca, L. y F. Bolívar, Purificación y caracterización de la cadena A para su asociación con el péptido B en la síntesis de insulina humana Reporte de la Unidad de Bioquímica de Proteína, CIIGB (UNAM)
- (42) Ambler, C.M. "Centrifuges and Centrifugation", en Encyclopedia of Chemical Processing and Design, Vol.7, Editada por J.J. McKetta y W.A. Cunningham, Marcel Dekker Inc, N.Y., 1985
- (43) Moir, D.N. "Sedimentation Centrifuges", Chemical Engineering, 28 Marzo, 1986
- (44) Higgins, J.J., et.al. "Investigation of the Unit Operations Involved in the Continuous Flow Isolation of Beta-Galactosidase from E.Coli" Biotechnology and Bioengineering, Vol. XX, p.159-182 (1979)
- (45) Williams, D.C., et.al. "Cytoplasmic Inclusion Bodies in Escherichia Coli producing Biosynthetic Human Insulin Proteins", Science, Vol.215, 5 Febrero, 1982, p.687-689
- (46) Hettwer, D. y H.Wang "Protein Release from Escherichia Coli Cells Permeabilized with Guanidine-HCl and TritonX100" Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXXIII, p.886-895 (1989)
- (47) Rehacek, J. y J.Scheafer "Disintegration of Microorganisms in an Industrial Horizontal Mill of Novel Design", Biotechnology and Bioengineering Vol. XIX, p.1523-1534 (1977)
- (48) Porter, M.C. "Applications of Membranes to Enzyme Isolation and Purification", Biotechnology and Bioengineering Symposia, Num.3, p.115-144 (1972)
- (49) Tutunjian, R.S. "Ultrafiltration processes in Biotechnology", Annals of the New York Academy of Science, Vol.413, p.238-253 (1983)
- (50) "Filtration and Membrane Separation" de Food Engineering Operations, p.142-153

- (51) Paulson, D.J., et.al. "Crossflow Membrane Technology and its Applications", Food Technology, Diciembre 1984, p.77-87
- (52) Cecil, P. y J.R.McPhee The Proteins, Vol.1, 2a.ed., Nueva York, Academic Press, 1963, p.350
- (53) Hirs,C.H.W., "Sulfitolysis" ,Methods in Enzymology, Vol.XI, S.P.Colowick y N.C.Kaplan (editores), Nueva York, Academic Press, 1967, p.207-208
- (54) Gross, E.H. "The Cyanogen Bromide Reaction", Methods in Enzymology, Vol.XI, S.P.Colowick y N.C.Kaplan (editores), Nueva York, Academic Press, 1967, p.238-253
- (55) Ladrón de Guevara, O.,et.al. "Identification and Isolation of Human Insulin A and B chains by high performance Liquid Chromatography" Journal of Chromatography, Vol.349, p.91-98 (1985)
- (56) Kang,K. y B.J.McCoy "Protein Separation by Ion Exchange Chromatography; A Model for gradient Elution" Biotechnology and Bioengineering, Vol.XXXIII, p.786-790 (1989)
- (57) Cruz N. "Obtención de Insulina humana a partir de la asociación de los derivados S-sulfonados de las cadenas A y B producidas en bacterias" Tesis de Licenciatura, ENEP Zaragoza (UNAM), 1984.
- (58) Bennett, R.C. "Matching Crystallizer and Material" Chemical Engineering, 23 Mayo, 1988
- (59) Johnson, R.D."The Processing of Biomacromolecules: A Challenge for the Eighties" Fluid Phase Equilibria, 29(1986), 109-123
- (60) Chance, R.E., et.al."The Production of Human Insulin using Recombinant DNA Technology and a new Chain Combination Procedure" Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium (1981)
- (61) Brookman, J.S.G. "Mechanism of cell desintegration in a high pressure homogenizer", Biotechnology and Bioengineering, Vol XVI, p.371-383 (1974)
- (62) Follows, M., et.al. "Release of enzymes from bakers' yeast by disruption in an industrial homogenizer" Biotechnology and Bioengineering, Vol.XIII, p.549-560 (1971).

- (63) Gosset, G., De Anda, R. y N. Cruz, Comunicación personal del equipo de trabajo del proyecto de insulina humana, Marzo-Agosto, 1989.
- (64) Gray, P.P., Dunhill, P. y M.D.Lilly "The Continuous flow isolation of enzymes". en Fermentation Technology Today, G.Tereyi (Editor), Japón, Society for Fermentation Technology, p.347-351 (1972).
- (65) Hanisch, W.H. et.al. "Separation and Purification Techniques Applicable to the Biological Processes" Proceedings of the Australian Biotechnology Confederation, p.153-170 (1982)
- (66) Hetherington P.J. et.al. "Release of protein from bakers' yeast (*Sacharomyces Cerevisiae*) by disruption in an Industrial Homogenizer" Transactions of the Institute of Chemical Engineering (EUA), Vol. 49, p. 142-148,
- (67) Leuthard, P. y A.R. Schuerech, "A Simple and rapid method for concentration of Interferon and Removal of Concentrated Inducin Virus", Experientia, 36(12), p.1447 (1980),
- (68) Marquadt, H. et.al. "Isolation and Characterization of a MSA-like Polypeptide Produced by a Human Fibrosarcoma Cell Line" Journal of Biological Chemistry, 255(19) p.9177 (1980)
- (70) Smiley K.C., et.al. "Alpha-Galactosidase Production and use in a Hollow-Fiber Reactor" Applied Environmental Microbiology 31(4), p615(1976);

## CAPITULO IV EVALUACIÓN ECONOMICA

### IV.A. Planteamiento del problema.

La Ingeniería genética ha abierto un camino para la producción a gran escala de nuevas proteínas y péptidos. Sin embargo, los problemas de ingeniería asociados a la obtención de productos de DNA recombinante han demostrado ser causados por la falta de comprensión de la problemática de los procesos de recuperación del producto(18). Siendo los primeros pasos de recuperación los más problemáticos (17).

Estos procesos presentan limitantes porque la cinética de crecimiento es lenta debido a la inestabilidad de los plásmidos a velocidades de crecimiento elevadas. Solo unos cuantos microorganismos tienen expectativas industriales serias, como son *Escherichia Coli*, *Sacharomyces Carevisiae*, algunas células de mamíferos y tal vez *Bacillus Subtilis* o algunas especies de *Pseudomonas* (5).

Los procesos para estos nuevos productos requieren de una investigación básica extensiva. Es necesario, por lo tanto, durante el transcurso de la investigación y desarrollo del proceso hacer evaluaciones económicas para determinar la viabilidad del proceso.

El potencial económico debe de ser una de las bases para escoger uno de los muchos proyectos existentes. El desarrollo de un proyecto depende en parte del análisis de

costos como justificación de su existencia. Proyectos alternos y perspectivas económicas de los mismos deberán considerarse mientras se desarrolla un proyecto en particular. El estudio económico deberá ser automatizado y actualizado constantemente para obtener análisis continuos de todos los proyectos, incluyendo en el que se trabaja, durante la investigación, desarrollo y optimización del mismo. El análisis se hace particularmente importante cuando el proyecto se encuentra en competencia con otros procesos de síntesis química, enzimática o fermentativa, ya establecidos.

Según Jelen (5) existen diferentes tipos de estudios concernientes a la estimación de inversión y costos: los estudios preliminares y los detallados. Los preliminares pueden ser: de "orden de magnitud" (con una exactitud entre +50 y -25%) y conceptual (entre +30 y -15%). Los detallados pueden ser semidefinitivos (+25,-15), definitivos (+15,-10) y final (+10,-5). Nuestro estudio caerá en la clasificación de conceptual. Según Perry's Chemical Engineers' Handbook (5ta.Ed), nuestro trabajo es un estudio de estimación(+/- 30%) donde se parte de la siguiente información: localización de la planta, diagrama de flujo del proceso esquematizado, lista de equipo preliminar con dimensiones y tipo, cantidades aproximadas de requerimiento de servicios, diagrama preliminar de tubería, y motores con tamaños y especificaciones, y número aproximado de horas hombre, sin incluir instrumentación ni aislamiento. En la figura 1 se



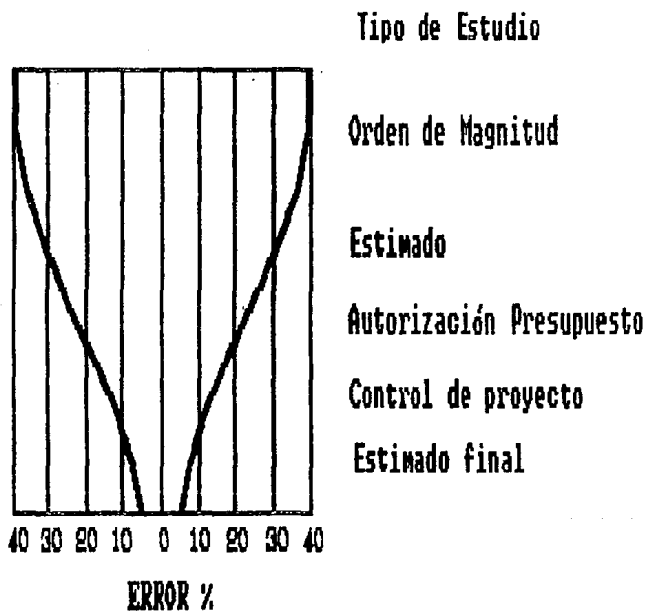


Figura 1 (Perry's Handbook, 5ta Ed.)

presentan tipos diferentes de estudios económicos y su exactitud.

Existen muchos métodos para realizar estudios preliminares, casi todos se basan en estimar los costos por partes a las cuales se les aplican factores individuales. Cada parte se suma para obtener la inversión total. Se escogió el método de Guthrie modificado usado por Kalk y Langlykke en (2), porque se apega más a lo que sucede al invertir en una planta con productos derivados de DNA recombinante.

El método de Guthrie(7) , utiliza módulos. Existe multiplicadores para estimar directamente de los costos del equipo (costo directo) los costos de materias y trabajo y costos indirectos de ingeniería y construcción. Este costo incluye el costo de traslado hasta la planta (free on board (f.o.b.)). La suma de los costos directos e indirectos se le llama costo de módulo simple. Este costo se puede calcular directamente multiplicando el costo del equipo (fob) por el factor de módulo simple (bare module factor (bmf)). Cuando se han calculado todos los módulos simples se suman otros elementos del costo fijo (contingencia y pago de servicios, equipo de manejo de sólidos, servicios(offsites), terrenos y acondicionamiento del sitio, y edificios). En este caso, los servicios(offsites) y los equipos de manejo de sólidos están incluidos en el módulo de equipo , ver figura 2.

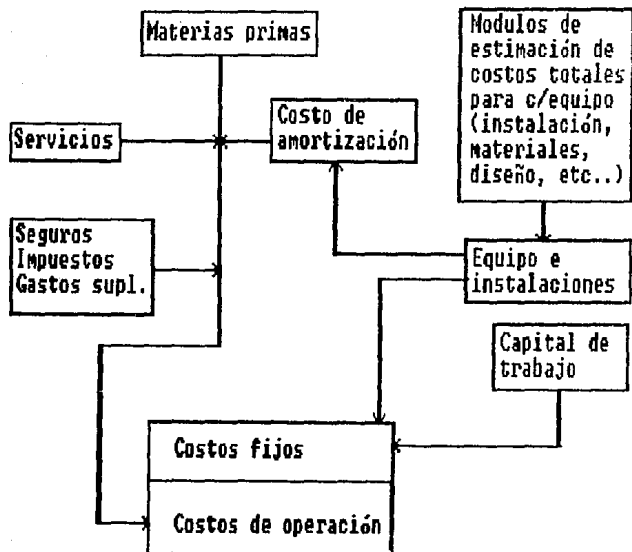


Figura 2 Análisis de costos  
(Guthrie)

Es importante mencionar que cada uno de estos factores incluidos en los bmf's pueden variar independientemente con el tiempo. Es por ello, y debido a que estos factores fueron obtenidos en 1969, que es necesario corregirlos individualmente mediante los índices inflacionarios. Otra corrección que debe efectuarse al utilizarlos es que estos factores toman en cuenta que el equipo está construido con acero al carbón y todos los equipos utilizados en el proyecto serán de acero inoxidable. Esto se hace aplicando el costo relativo del acero inoxidable con respecto al acero al carbón. (factor de 2.25 (4)). Actualmente no se puede saber con certeza cuánto cuesta un equipo de acero inoxidable porque los precios varían mucho por el alto costo de los materiales de construcción (14). Es importante mencionar que debido a que muchos de los equipos de la industria biotecnológica no están incluidos en el estudio de Guthrie fue necesario tomar el valor de equipos de funcionamiento similar. Este fue el caso del homogeneizador al cual se le aplicó el factor correspondiente a una bomba recíproca. Otro ejemplo, es la ultrafiltración donde fue necesario tomar un valor estimado dado que el tamaño del equipo es pequeño y por lo tanto no requiere de alto costo de instalación e ingeniería (1).

El esquema que se utilizó para conocer la inversión necesaria para realizar el proyecto fue el mismo para los dos escenarios.

#### IV.B. Evaluación del Escenario I (pruebas clínicas)

##### IV.B.1 Inversión y costos:

El esquema para conocer los costos del escenario I se dividió en dos partes : costos fijos y costos de operación. En la tabla 1 (tabla general) se hace un resumen de los costos parciales generados en las tablas 2,3,4 y 5. En la primera parte de la tabla 1 donde se ve "capital invertido", se incluyeron el costo de los equipos, el costo del terreno, acondicionamiento e instalaciones, lo necesario para poner en funcionamiento la planta (costo de arranque) y los costos de ingeniería. Sin embargo, estos últimos no fueron tomados por separado debido a que se encuentran incluidos en los factores de Guthrie. Es importante señalar que en lo relativo al costo del arranque de la planta, en el caso de la industria biotecnológica, debido a la inexperiencia en las nuevas tecnologías, éste puede representar hasta un 50% de los costos fijos (1). Nosotros tomamos un valor de 10 % considerando que se cuenta con personal que tiene la experiencia necesaria para echar a andar este tipo de tecnologías (CIIGB).

El capital de trabajo se calculó considerando materia prima para un periodo de tres meses y costos de operación para un mes. Los costos del equipo se pueden ver con detalle en la tabla 2.

En la parte de costos de operación de la tabla 1 se incluyeron las materias primas (tanto las relacionadas directa como indirectamente con el proceso) y

TABLA I

Inversion, costo operacion y costo unitario - Escenario I -	Costo (\$US)
=====	
Capital Invertido	
Equipo	214186
Edificios(15% Capital fijo)	0
Terreno, asentamiento(7% Cap. fijo)	0
Costo de Arranque(10% Cap. fijo)	31497.94
-----	
Capital fijo	245683.9
Capital de trabajo(3 meses de materias prim. + 1 mes costo op.)	22669.61
-----	
	268353.5
Costo de Operacion(anual)	
Materias primas y abastecimientos	26501.87
Salarios y honorarios	69237.5
Servicios	372.2238
Equipo(amortizado)	69281.34
Edificios(Amort. 30 anos, 12% int.)	0
Impuestos y seguro(4% Costo fijo)	9827.358
Gastos suplementarios(Overhead)	
25% de salarios y honorarios)	17389.38
-----	
Total(\$US/ano)	192529.7
Volumen de produccion(Kg/ano)	0.275
Costo. del producto (dolares/kg)	700107.9
Costo unitario frasco(sin ganancias)	26.92755

abastecimientos, los servicios (incluyendo los necesarios para el tratamiento de efluentes), los salarios y prestaciones para personal que laborará en la planta, impuestos y gastos de seguro, los indirectamente relacionados con la operación en la planta tales como servicios sanitarios, seguridad en la planta y cafetería, así como el costo de amortización (tanto para los equipos como para las instalaciones).

Se utilizó el costo de amortización de los equipos para tomar en cuenta la parte de costos de operación del capital inicial en lugar de manejar la depreciación y los intereses en forma separada debido a que para efectos de un estudio preliminar resulta más conveniente (1). Ver tabla 2. Los equipos se amortizaron a 10 años y se tomó una tasa de interés del 12%, mientras que para las instalaciones fue para un periodo de 30 años.

Los costos de materias primas y abastecimientos se aprecian en la tabla 3. Estos costos corresponden al precio ACS o USP (reactivo laboratorio) para sustancias abajo de los 500 g. Los datos son de catálogo. Los precios para los demás productos se obtuvieron directamente por cotización con los distribuidores o en el caso de no contar con los precios se tomó un precio aproximado 10 veces menor al precio de laboratorio (esto es lo que normalmente sucede con los precios de los productos vendidos a granel). También es necesario aclarar que muchos de los reactivos tienen que ser

TABLA 2

Equipo instalado -Escenario I-

Tipo	Cantidad	Costo (US\$)
<b>Preparación del Inoculo</b>		
Tanque Preparador 1/2 Fermentación	1	500
Fermentador 1 l	0	0
Fermentador 20 l	0	0
Fermentador 500 l	0	0
<b>Recuperación</b>		
Centrifuga disco(2500 l/h)	0	0
Microfiltro (C30)	1	4770
Manton-Gaulin(200 l/h)	0	0
Ultrafiltro (C30)	1	4770
Reactor 20 l	1	3050
Rotavapor Buchi(25 l)	0	0
Liofilizador	0	0
Sistema HPLC Preparativo	0	0
<b>Asociación</b>		
Reactor 70 l	1	24000
Cristalizador 100 l	1	2E00
<b>Auxiliar</b>		
Bombas	12	13650
Compresores	1	20000
Intercambiadores	2	3000
Equipo refrigeración	0	0
Tanque mezclado	12	46300
Torre enfriamiento	0	0
Caldera	0	0
Sub-estacion	0	0
Equipo Laboratorio		20000
Equipo Oficina		10000
Subtotal (US\$)		152990
Contingencia (40%)		61196
TOTAL		214186
COSTO AMORTIZACION (US\$)	69201.34	

0,3 tasa  
10 interes  
10 años

TABLA 3

Materias Primas y abastecimientos Escenario I

Fermentación:	Cantidad (Kg/año)				Costo Subtotal (US\$/año)
	Conc. (Kg/L)	Tanque I	Tanque II	Tanque III	
Glucosa	0,066	0,066	0,66	23,1	0,3 7,1473
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0045	0,0045	0,45	1,575	17,5 26,42975
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,003	0,003	0,33	1,05	10 10,83
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,003	0,003	0,03	1,05	10 10,83
MgSO <sub>4</sub>	0,002	0,002	0,02	0,7	10 7,22
Levadura	0,005	0,005	0,65	1,75	1,47 2,65305
Triptofan	0,01	0,01	0,1	3,5	145 523,45
Antiesp.	0,001	0,001	0,01	0,35	100 36,1
Trzas (ml)	3	3	30	1050	0,014713 15,93472
Total (US\$/año) 642,5946					
<b>Recuperación y asociación:</b>					
Costo					
	Cantidad (Kg/año)	Unitario (US\$/kg)	Subtotal (US\$/año)		
Acido Fórmico	150,5688		3 451,7064		
Bromuro de cianogeno	18,744	150	3561,36		
Cloruro de guanidinio	168	0,562	97,776		
Tetratromato de sodio	4,272	10,25	43,780		
Sulfito de sodio	2,24	10,25	24,71		
Urea	2,14	7,25	15,515		
Glicina	0,6636	12	8,0352		
Tris	1,0616	13,34	14,16174		
DIT	0,208	4900	1019,2		
Sulfato de Zinc	0,86656	20	1,3312		
Acetona	0,3276	5	1,638		
Reactivos HPLC			5000		
<b>Mallas ultrafiltración</b>					
Cut-off(0,1 mic)MF01-43(3/0,45 a2)		2	429,3	858,6	
Cut-off(10'S MF)P10-20(3/0,45 a2)		1	429,3	429,3	
Cut-off(1000 MF)HSP1-3(3/0,45 a2)		1	429,3	429,3	
Cut-off(5000 MF)HSP-43(3/0,45 a2)		1	429,3	429,3	
Total (US\$/año) 12455,72					
<b>Abastecimientos:</b>					
Costo (US\$/año)					
para Operación(33 salarios operacion)				895,104	
para Laboratorio(40% salarios laboratorio)				3870,72	
para Mantenimiento(100% salarios mantenimiento)				5644,9	
Otros(10% de gastos suplementarios)				1730,938	
Total (US\$/año) 12141,56					
Subtotal:				25239,86	
Contingencia(5%):				1261,994	
TOTAL (US\$/año)				26501,87	



grado laboratorio porque se requiere de gran calidad en el producto.

En el caso de abastecimientos para operación, mantenimiento y laboratorio fueron calculadas con porcentajes reportados en (1). Fue necesario tomar en cuenta un por ciento de contingencia debido a posibles pérdidas o accidentes. En los servicios tales como el agua y el vapor también fue aplicado este porcentaje de contingencia.

Los salarios se encuentran reportados en la tabla 4. Estos se calcularon en base a salarios mínimos. Varían de acuerdo al puesto, desde un salario mínimo para un trabajador en planta hasta cinco salarios mínimos para el jefe de producción.

En la tabla 5 se pueden ver los costos calculados para los servicios. Se incluyeron gastos de agua, energía eléctrica, vapor y tratamiento de desechos. Los costos de energía eléctrica y del agua fueron obtenidos de una planta industrial localizada en Toluca.

Los impuestos y gastos de seguro de la tabla 1 se tomaron como un porcentaje del capital fijo y los gastos suplementarios de planta se calcularon como un porcentaje del costo de salarios y prestaciones.

Por último, al final de la tabla 1 se calcula el costo aproximado de la insulina producida en la planta del CIIGB con la tecnología del propio centro. Se puede ver que está muy por encima del precio de venta de la insulina en el mercado internacional (13 dólares). Pero cabe aclarar que

TABLA 4

Salarios y pago de servicios honorarios  
Escenario I

Categoría	Numero Empleados Requeridos	\$/US/día de trabajo	Costo Anual (US/ano)
Jefe de Produccion	1	18	224 4032
Supervisor Mantenimiento	1	14.4	224 3225.6
Jefe de turno	3	10.8	224 7257.6
Secretaria	2	7.2	224 3225.6
Recepcion y embarque	2	3.6	224 1612.8
Fermentacion	6	3.6	224 4638.4
Recuperacion	12	3.6	224 9676.8
Union	3	3.6	224 2419.2
Laboratorio	6	7.2	224 9576.8
Mantenimiento	3	3.6	224 2419.2
Tiempo extra(6%)			48384 2907.04
Subtotal			51287.04
Frecuencias(25%)			17950.46
TOTAL (US/ano)			69237.5

TABLA 5  
Servicios Escenario I

tipo	Consumo anual	Costo Unitario	Costo Anual (US/ano)
Vapor			
Esterilizacion	2720	0.0145	39.896
Recuperacion solventes	0	0	0
Contingencia(25%)			9.724
Subtotal (US/ano)			48.62
Agua			
Proceso	15000	0.0005	7.5
Enfriamiento	25200	0.0005	17.6
Alta Pureza	2200	0.002	4.6
Contingencia(10%)			2.97
Subtotal (US/ano)			32.67
Electricidad			
Pre-fermentacion	20	0.06	1.2
Fermentacion			
Aeracion	1760	0.06	105.6
Agitacion	262	0.06	15.72
Centrif. o Ultraf.	16.1	0.06	0.966
Homogenizador	27.14	0.06	1.6284
Agitadores	10	0.06	0.6
Nota-sador	202	0.06	18.12
Bombas	149	0.06	8.4
Refrigeracion	336	0.06	20.16
Torre de Enfriamiento	120	0.06	7.2
Ilum., Vent. y Otros			17.95944
Subtotal (US/ano)			197.5538
Tratamiento de desechos			
Agentes quimicos	0.03	2415	72.45 ****
Agentes biologicos	0.002	10465	20.93 *****
Subtotal (US/ano)			93.38
TOTAL (US/ano)			372.2236

este precio no incluye envasado, empaque, propaganda y distribución y es además el precio de un producto obtenido en planta piloto sin optimizar. En las figura 3a, 3b y 3c se aprecia un resumen de los costos de proyecto para el escenario I. Se puede observar que los costos fijos, de operación y totales de la fermentación, la separación y la asociación son muy similares. En la figura 4a, 4b y 4c se dan los costos desglosados para cada etapa del proceso (fermentación, separación, asociación). Se nota que el principal costo se debe a la inversión en equipo, claro reflejo de la gran cantidad de pasos del proceso. Es muy importante aclarar que estos costos son el reflejo de tener parte de la inversión realizada.

#### IV.B.2 Análisis de Sensibilidad.

Se presentarán a continuación en la tabla 6 y las figuras 5 y 6, los análisis de sensibilidad del escenario I. Estos se realizaron de la siguiente manera: se escogieron diferentes parámetros a variar con el fin de crear diferentes panoramas de un mismo escenario. Cuando se varia un parámetro se especifica qué modificaciones se hicieron al proceso de cálculo de costos antes descrito y se presentan los resultados en la tabla 6.

En la figura 5 se presentan los resultados graficados del cambio en el costo fijo y del cambio del costo de operación. Se puede ver que el efecto del cambio en costos fijos para el escenario I es muy marcado con respecto al cambio en los costos de operación. En la figura 6 se pueden

### Costos Fijos Proyecto I

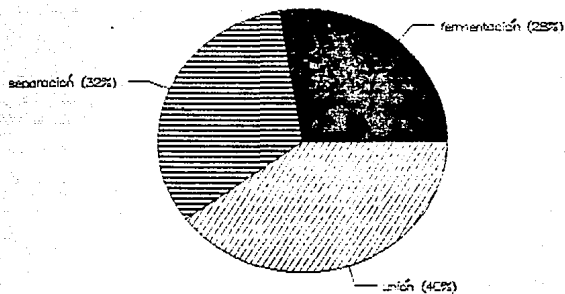


Figura 3a

### Costos de Operación Proyecto I

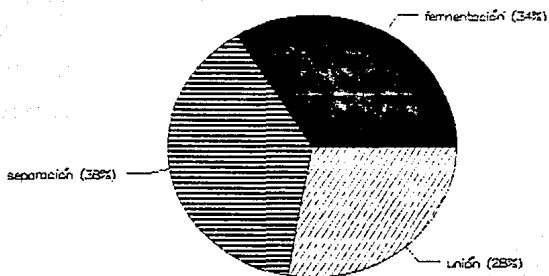


Figura 3b

# Costos Totales\* Proyecto I

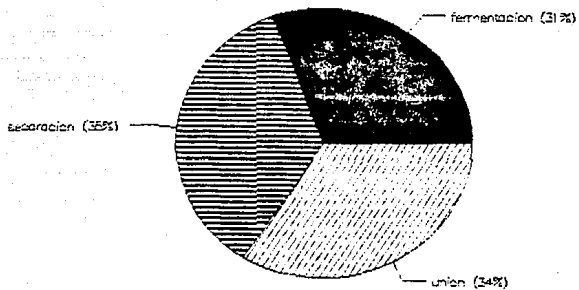


Figura 3c

\* primer año

### Costos de fermentación Proyecto I

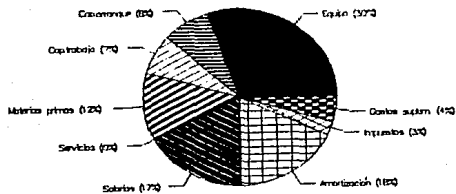


Figura 4a

### Costos de separación Proyecto I

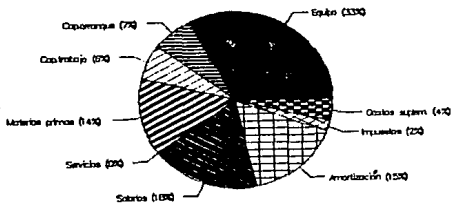


Figura 4b

### Costos de asociación Proyecto I

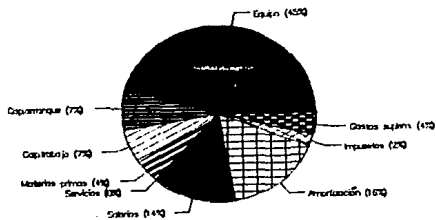


Figura 4c

TABLA 6

Análisis de sensibilidad para el proyecto de insulina humana (Escenario I)

1 Cambio en la concentración de biomasa				2 Cambio de Volumen de fermentación				4 Cambio X de Costo Fijo***	
Aumentan linealmente los volúmenes y los precios en la separación y la purificación, Aumentan algunos costos de servicios linealmente, así como la cantidad de insulina/año				Cambio Volumen	Kg insuli al año	Cost.U. \$US/frasc	Inversion \$US	Cambio	Costo Unitario
Xf (g/l)	Kg insuli al año	Cost.U. \$US/frasc	Inversion \$US	0,5	0,145	42,83	174000	60	27,77
				1	0,29	26,89	270000	40	27,5
				1,5	0,435	30,22	678000 *	20	27,25
				2	0,58	25,39	773000 *	0	26,98
				3	0,87	24,9	1276000 *	-20	26,72
								-40	26,46
								-60	26,2
1	10	0,145	44,38	176000	Aumentan las mismas cosas que en 1, además aumenta por fermentación y servicios * incluye la compra de nuevos equipos de fermentación				
1	15	0,2175	32,7	222000	5 Cambio X de Costo Operación***				
2	20	0,29	26,85	278000					
2	25	0,3625	23,34	316000					
3	30	0,435	21	362000					
3	35	0,5	19,33	408000					
4	40	0,58	18,08	455000					
5	50	0,725	16,33	550000					
La eficiencia de recuperación tiene un efecto parecido, solo que no cambian los costos de los equipos.				3 Ahorro por equipo	Costo U. Inversion (\$US/fras (\$US)		Cambio	Costo Unitario	
					26,89	270000	60	36,68	
				Sin equipo	70,32	1510000	40	33,58	
				Con equipo			20	30,28	
							0	26,98	
							-20	23,68	
							-40	20,39	
							-60	17,08	
				*** No se considera la depreciación de los equipos ya adquiridos.					

figura 5 Sens.Econo. Escenario I  
cambio % costos fijos y de operación

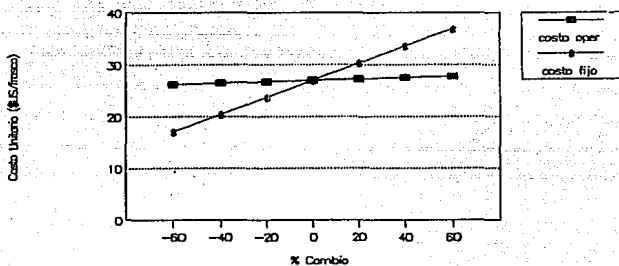
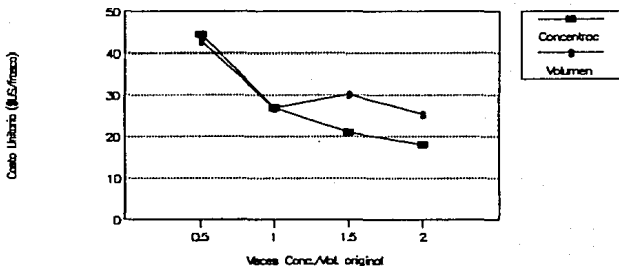


figura 6 Sens.Econo. Escenario I  
cambio Concentración y Volumen (Ferm.)





observar los resultados del cambio en la concentración de biomasa final y el volumen de fermentación. El cambio abrupto en la curva del cambio de volumen se debe a la inversión que se tiene que hacer al comprar equipo más grande de fermentación.

#### IV.C Evaluación del escenario II (insulina rápida SSA)

##### IV.C.1 Inversión y costos.

Para estimar los costos se siguieron los mismos lineamientos que se siguieron para calcular la inversión para el escenario I. Se presentan a continuación los resultados en las tablas 7,8,9,10,11.

El costo de manufactura está por debajo del precio de venta internacional de la insulina, pero este no incluye los gastos de envasado, empaque, propaganda y distribución. El costo es bastante elevado a pesar de estar por debajo del precio internacional. En las figuras 7,8 y 9 se presentan comparaciones entre los costos. Se puede observar en la figura que la inversión en costo fijo es el costo mayor. De los costos de equipo los fermentadores representan el costo más grande (figura 8a). Este análisis refleja con mayor claridad como están distribuidos los costos de inversión, cosa que no sucede con el escenario I.

##### IV.C.2 Rentabilidad

Para calcular la rentabilidad se utilizaron los criterios más comunes: el valor presente neto (NPV), el tiempo de recuperación de la inversión y la tasa interna de retorno (DCFRR). Utilizando el análisis de costo y

T A B L A 7

Inversion, costo de operacion  
y costo unitario - Escenario II - Costo  
(\$US)

-----	
Capital Invertido	
Equipo	3289188
Edificios(15% Capital fijo)	725556.3
Terreno, asentamiento(7% Cap.fijo)	338592.9
Costo de Arranque(10% Cap.fijo)	483704.2
	-----
Capital fijo	4837042
Capital de trabajo(3 meses de materias prim. + 1 mes costo op.)	149244.5
	-----
	4986286
Costo de Operacion(anual)	
Materias primas y abastecimientos	83642.21
Salarios y honorarios	84238.96
Servicios	3579.104
Equipo(amortizado)	1063992
Edificios(amort. 30 anos, 12% int.)	190073.21
Impuestos y seguro(4% Costo fijo)	193481.7
Gastos suplementarios(Overhead)	
25% de salarios y honorarios)	21059.74
	-----
Total(\$US/ano)	1540007
Volumen de produccion(kg/ano)	6.05
Costo del producto(dolares/kg)	254546.6
Costo unitario frasco(sin ganancia)	9.790255

TABLA 8  
Equipo instalado Escenario II

Tipo	Cantidad	Costo (R\$)
<b>Prefermentacion</b>		
Tanque Preparador 1/2	2	90000
<b>Fermentacion</b>		
Fermentador 1 l	2	40000
Fermentador 20 l	2	80000
Fermentador 500 l	2	366000
Fermentador 4000 l	-	924000
<b>Recuperacion</b>		
Centrifuga disco(25000 l)	0	0
Microfiltro DC120P	1	16200
Manton-Gaulin(250 psi)	1	37040
Centrifuga disco(2000 l/h)	0	0
Ultrafiltro DC120P	1	16200
Reactor 250 l	1	167000
Evaporador al vacio	1	15000
Liofilizador	1	25000
Tanque cristalización 70l	1	1500
Sistema HPLC(150 l/min)	4	160000
<b>Asociacion</b>		
Reactor 700 l *	1	36000
Tanque cristalización 10l	1	500
<b>Auxiliar</b>		
Bombas	12	15000
Compresores	1	20000
Equipo refrigeracion	1	5000
Tanque mezclado	12	61800.3
Torre enfriamiento	1	88180
Caldera	2	120000
Sub-estacion	1	15000
Equipo Laboratorio		20000
Equipo Oficina		10000
Subtotal (R\$)		2349420
Contingencia (40%)		939768.1
TOTAL		3289188
COSTO AMORTIZACION(R\$)	1063932	0.3 interes 10 años

TABLA 9

Materias primas y abastecimientos - Escenario II -

	Conc. (Kg/L)	Cantidad (Kilos/año)			Costo	
		Tanque(I)	Tanque(II)	Tanque(III)	Unitario (R\$/KG)	Subtotal (R\$/año)
Glucosa	0.066	0.066	0.66	23.1	184.8	0.3 62.5676
MH2FO4	0.0045	0.0045	0.045	1.575	12.6	7.6 106.1062
K2HPO4	0.003	0.003	0.03	1.05	8.4	1.25 11.85375
K2HP04	0.003	0.003	0.03	1.05	8.4	1.25 11.85375
MgSO4	0.002	0.002	0.02	0.7	5.6	0.75 4.7415
Levadura	0.005	0.005	0.05	1.75	14	1.47 23.23325
Triptofan	0.01	0.01	0.1	3.5	28	1.45 45.8345
Antiesp.	0.001	0.001	0.01	0.35	2.8	100 316.1
Trzas(1)	3	3	30	1050	8400	0.005704 54.08629
						Total(R\$/año) 1276.794

Recuperacion y union:

	Costo		
	Cantidad (kg/año)	Unitario (R\$/KG)	Subtotal (R\$/año)
Acido Formico	3300	1.5	4950
Bromuro de cianogeno	392.271	19	7453.149
Cloruro de Guanidinio	3721.575	0.582	2165.967
Tetratosonato de sodio	189.75	10.25	1944.936
Sulfato de sodio	94.05	10.25	964.0125
Urea	262.976	0.725	209.0651
Glicina	14.464	1.334	19.29498
Tris	23.36	1.2	28.032
DTT	4.624	4900	22657.6
Sulfato de Zinc	6.039	11.75	70.95825
Acetona	6.4952	5	32.476
Reactivos HPLC			5000
Malla C-0. 0.1 micra (2.8 M2)(4 cart.)		2	7124
Malla C-0. 10*5 (2.8 M2)(4 cart.)		1	3562
Malla C-0. 5000 (2.8 M2)(4 cart.)		1	3562
Malla C-0. 1000 (2.8 M2)(4 cart.)		1	3562
			Total(R\$/año) 63301.5

Abastecimientos:

	Costo(R\$/año)
para Operacion	1040.756
para Laboratorios	2870.72
para Mantenimiento	8064
Otros	2105.974
Total(R\$/año) 15080.95	
Subtotal:	79659.25
Contingencia(5%):	3982.962
TOTAL(R\$/año)	83642.21

TABLE 10  
Salaries and pago de servicios(honorarios)  
Escenario II

Categoría	Numero Empleados	US/dia	dias trabajo	Costo Anual (US/ano)
Jefe de Produccion	1	18	224	4032
Supervisor Mantenimiento	1	14.4	224	3225.6
Jefe de turno	3	10.8	224	7257.6
Secretaria	4	7.2	224	6451.2
Recepcion y embarque	2	3.6	224	1612.8
Fermentacion	8	3.6	224	6451.2
Recuperacion	15	3.6	224	12096
Union	4	3.6	224	3225.6
Laboratorio	6	7.2	224	9678.8
Mantenimiento	6	3.6	224	4898.4
				58867.2
Tiempo extra(6%)				3532.032
Subtotal				62999.23
Prestaciones(35%)				21839.73
TOTAL(US/ano)				84238.96

TABLE 11  
Servicios - Escenario II -

tipo	Consumo anual	Costo Unitario	Costo Anual (US/ano)
Vapor			
Esterilizacion	20532	0.0143	294.4656
Recuperacion solventes	580	0.0143	7.15
Contingencia(25%)			75.4039
			Subtotal(US/ano) 377.0195
Agua			
Proceso	332800	0.0005	166.4
Enfriamiento	806190	0.0005	403.095
Alta Pureza	24640	0.002	49.28
Contingencia(10%)			61.8775
			Subtotal(US/ano) 680.6525
Electricidad			
Pre-fermentacion	42.208	0.06	2.53248
Fermentacion			
Aeracion	3332.8	0.06	199.968
Agitacion	394	0.06	23.64
Centrifugas/Ultra	315	0.06	18.96
Homogenizador	560	0.06	33.6
Agitadores	70	0.06	4.2
Evaporador	302	0.06	18.12
Bombas	250.5	0.06	15.03
Refrigeracion	336	0.06	20.16
Torre de Enfriamiento	120	0.06	7.2
Ilum.,Vent.y Otros			34.34105
			Subtotal(US/ano) 377.7515
Tratamiento de desechos			
Agentes quimicos	55440	0.03	1663.2
Agentes biologicos	240240	0.002	480.48
			Subtotal(US/ano) 2143.69
TOTAL(US/ano)			3579.104

### Costos Fijos Proyecto II

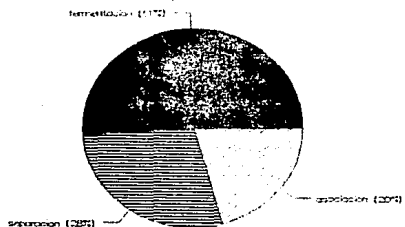


Figura 7a

### Costos de operación Proyecto II

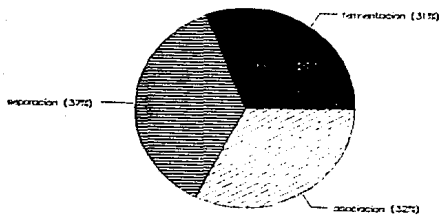


Figura 7b

### Costos Totales Proyecto II

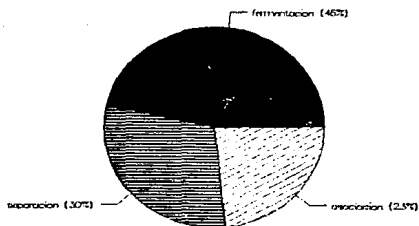


Figura 7c

### Distribución del costo de equipo ( Escenario II )

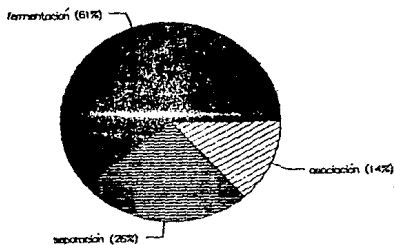


Figura 8a

### Distribución del costo de materias primas ( Escenario II )

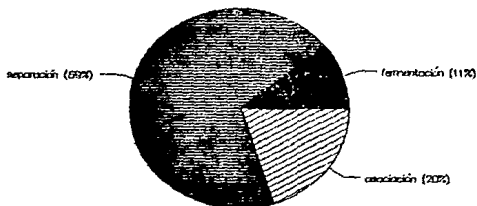


Figura 8b

### Distribución del costo de servicios ( Escenario II )

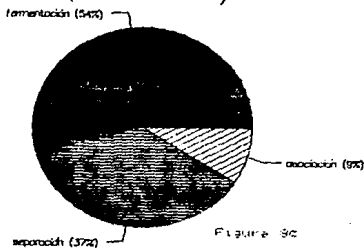


Figura 8c

Costos de fermentación  
Proyecto II

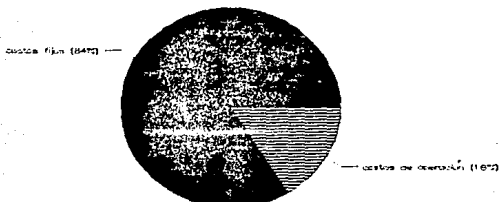


Figura 2a

Costos de Separación  
Proyecto II

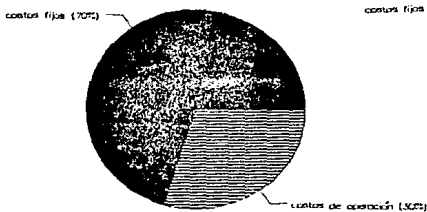


Figura 2b

Costos de Asociación  
Proyecto II

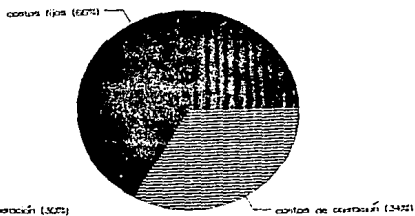


Figura 2c

Costos Totales  
Proyecto II

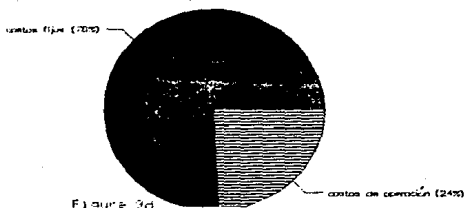


Figura 2d

proponiendo un precio de venta igual al precio de venta internacional para la insulina humana (13 dólares) se puede calcular cuanto se obtendría de ganancias durante un año. A las ganancias en bruto se le resta los gastos de presentación y distribución del producto (20% del costo de manufactura) y se obtiene las ganancias netas anuales.

Para el análisis de rentabilidad se hacen las siguientes suposiciones: que se va a analizar la rentabilidad después de 10 años, tiempo en que los equipos se han depreciado totalmente y no tienen valor como chatarra; que las ganancias se mantienen constantes y que se produce a la máxima capacidad durante los diez años de operación de la planta; y que el impuesto es el 50 % de las ganancias. En la tabla 12 se presentan los resultados.

También en la tabla 12 se presenta un análisis de rentabilidad incluyendo el efecto de la inflación. Cuando la inflación se incluye, afecta directamente al valor presente neto (6). Se tomó un índice de inflación del 20% anual (ii). La tasa interna de retorno se llama ahora tasa interna de retorno con inflación (ia) (6). Se puede notar claramente que el efecto de la inflación es devastador.

#### IV.C.3 Análisis de sensibilidad.

Como en el escenario I, se probaron diferentes variaciones que se explican en la tabla 13. Ahora se incluye el cálculo del costo del frasco y de la tasa interna de retorno con y sin inflación. En la figura 10 se puede ver el cambio en los costos fijos y los costos de operación. Se





TABLA 13

Análisis de sensibilidad para el proyecto de insulina humana (Escenario II)

1 Cambio en la concentración de biomasa*					2 Cambio Volumen de fermentación*					4 Cambio X de Costo Operación*					7 Cambio precio de venta***							
* Se hacen los mismos supuestos que en la sensibilidad para Escenario I					Cambio	Kgms/año	MUS/frs	DCFRR	ie	Cambio	MUS/frs	DCFRR	ie	60	10.11	-0.001	-0.17	venta	DCFRR	ie		
					0.5	3.2	11.73	-0.021	-0.19	40	9.86	0.004	-0.16	20	9.6	0.009	-0.158	9	-0.05	-0.21		
					1	6.4	9.25	0.015	-0.15	0	9.35	0.015	-0.154	11				11	-0.02	-0.18		
Xf (g/l)					1.5	9.6	8.56	0.023	-0.14	-20	9.1	0.02	-0.15	13				13	0.015	-0.15		
					2	12.8	8.17	0.043	-0.13	-40	8.85	0.025	-0.146	15				15	0.046	-0.128		
10	3.2	16.97	-0.086	-0.24	2.5	16	7.93	0.05	-0.125	-60	8.6	0.03	-0.14	20				20	0.12	-0.06		
15	4.8	11.89	-0.032	-0.19	3	19.2	7.77	0.054	-0.12													
20	6.4	9.25	0.15	-0.15	3 Cambio X de Costo Fijo*					5 Proteína intra o extracelular					8 Cambio en la inflación***							
25	8	7.83	0.925	-0.12																		
30	9.6	6.81	0.89	-0.09																		
35	11.2	6.09	0.12	-0.055																		
40	12.8	5.55	0.15	-0.04	Cambio	MUS/frs	DCFRR	ie	60	10.7	-0.04	-0.22	Se suite paso de rompimiento y cianogenolisis					Zinflación				
45	16	4.78	0.2	-0.01					40	10.83	-0.04	-0.2	Aumenta la eficiencia recuperacion extracelular/precio 6.6/DCFRR=0.097,ie=-0.085					0				
									20	9.7	-0.017	-0.18						5				
									0	9.20	0.015	-0.15						10				
									-20	9.01	0.06	-0.12						15				
									-40	8.67	0.12	-0.06						20				
									-60	8.33	0.24	0.036						25				
																		30				
																		50				
																		100				
																		-0.5				

\*\*\* El precio de venta base es: 12 MUS que es el precio de venta intl. (1999) El % inflación base es de 20.

## Sensibilidad Económica Proyecto II cambio concentración y volumen

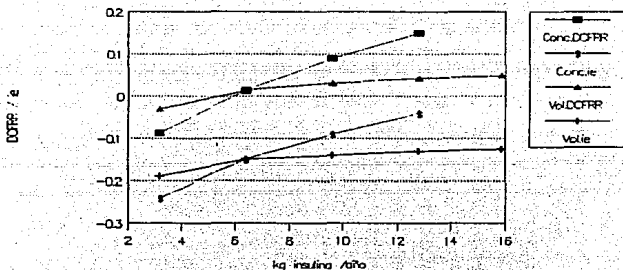


Figura 11

## Sensibilidad Económica Proyecto II cambio % Costos fijos y operación

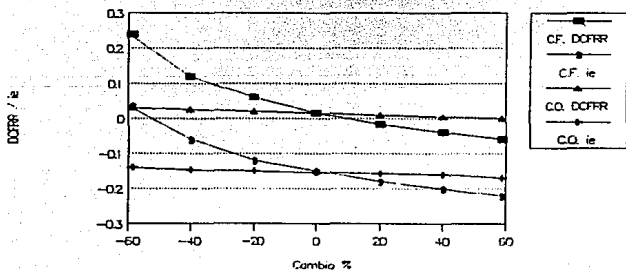


Figura 10

puede ver que los costos fijos dominan la inversión del proyecto. En la figura 11 se ve el cambio en concentración final de biomasa y el volumen de fermentación. Se puede notar con claridad que hay que aumentar la concentración de biomasa final más allá de los 40 g/l para que el proyecto sea rentable. Por último, en las figuras 12 y 13 se ve el cambio en el precio de venta del producto y el efecto de la inflación.

## Sensibilidad Económica Proyecto II cambio precio de venta por frasco

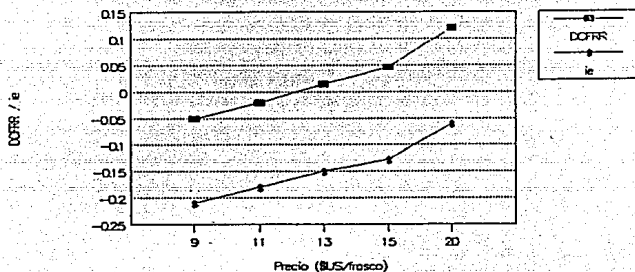


Figura 12

## Sensibilidad Económica Proyecto II respecto a la inflación

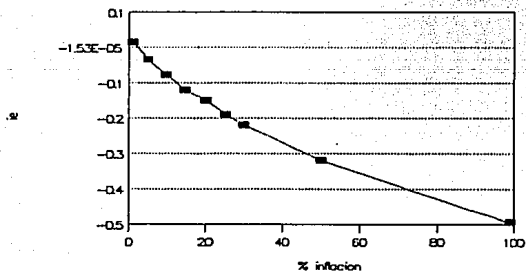


Figura 13

#### IV.D Bibliografía :

- (1) Jelen, F.C. y J.H.Black, Cost and optimization Engineering 2a.ed.,Tokyo, McGraw-Hill, 1983. 538p (International Student's Edition)
- (2) Demain, A.L. y N.A.Solomon Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Washington (D.C.), American Society of Microbiology, 1986, 466p.
- (3) Rudd, D.F. y C.C.Watson Strategy of process engineering, Nueva York, John Wiley and Sons Inc., 1968, 460p.
- (4) Perry, R.H.,y D.Green Perry's Chemical Engineers' Handbook Sixth Edition, Singapur, McGraw-Hill, 1984. (International Student's Edition)
- (5) Bailey, J.E. y D.F.Ollis. Biochemical Engineering Fundamentals 2a.ed., Singapur, McGraw-Hill International Editions, 1986, 984p.
- (6) Datar R."Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering" Process Biochemistry, Febrero,1986,pp 19-26.
- (7) Guthrie,K.M."Data and techniques for preliminary capital cost estimating" Hydrocarbon Processing, Num. 1986, 1968. pp 80-105.
- (8) Hall R.S.et.al., "Process equipment", Chemical Engineering, Abril 5, 1982, pp 81-95.
- (9) Holland, F.A. et.al., "Sensitivity analysis of project profitabilities" CE Refresher, part 6, Chemical Engineering, Octubre 29,1973. pp 115-175.
- (10) Holland, F.A. et.al., "Estimations profitability when uncertain exist".CE Refresher, part 10, Chemical Engineering, Febrero 4, 1974, pp 73-79.
- (11) Ludwig, E.E. "Cost,Capital Estimation" Encyclopedia of Chemical Processing and Design, McKeeta, J.J. y W.A.Cunningham (editores), Vol.12, Nueva York, Marcel Dekker Inc., 1985.
- (12) Hoerner G.M. "Cost-Process Equipment (Updating)" Encyclopedia of Chemical Processing and Design, McKeeta, J.J. y W.A.Cunningham (editores), Vol.12, Nueva York, Marcel Dekker Inc., 1985.
- (13) Hall, R.S., et.al. "Estimating Process Equipment Costs" Chemical Engineering, Noviembre 21,1988

- (14) Emerson, C., et.al. "Higher Metal Prices Plague Equipment Vendors" Chemical Engineering, Septiembre 12, 1988
- (15) Hall, R.S., et.al. "Current Costs of Process Equipment" Chemical Engineering, Abril 5, 1982
- (16) Benning, M.A. "Estimating Costs of Process Development Units" Chemical Engineering, Enero 19, 1987
- (17) Bowden, C.P. Proceedings Biotechnology, 1984, Online Confs., 2, pp 139
- (18) Rosen, C.G. y R. Datar, Proceedings Biotechnology, 1983, Online Confs., p 20

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

La diabetes es una de las enfermedades más importantes en México (en morbilidad y mortalidad). Según la estimación de este estudio: existen 2,400,000 diabéticos, la dosis diaria promedio para el grupo de consumidores de insulina es de 15 U.I./día, el sector salud consume el 70% de la insulina en México, el mercado de consumo de insulina para 1989 es 56 Kg/año, y el consumo esperado para el año 2000 esta entre 81 y 110 kg/año.

El mercado esta monopolizado y se introducirá proximately la insulina humana.

Se logró conformar la tecnología a nivel piloto e industrial. Se encontraron diferentes alternativas para el escalamiento y se evaluaron técnica y económicamente. Así mismo, se delimitaron las variables que limitan técnica y económicamente el proceso.

El proyecto de producción de insulina humana CIIGB-UNAM demanda, según lo estimamos en este proyecto, de las siguientes condiciones:

1) Se necesita 610.2 kilogramos de biomasa (peso seco) para producir un kilogramo de insulina.

2) De un kilogramo de biomasa (peso seco) el 65 % son proteínas, de esto el 20% es de proteína híbrida y el 20% de la proteína híbrida es cadena A o B. Se necesita 3.33 Kg de cadena A y 1.66 se cadena B para obtener 1 kg de insulina.



La separación y purificación tienen un rendimiento aproximado de 30%.

3) El escenario I requiere: una inversión inicial de 270,000 dólares, un costo de operación de 193,000 dólares al año y un costo de manufactura de 27 dólares por cada frasco de mil unidades internacionales (sin incluir costos de empaque y envasado).

4) El escenario I costaría 2.6 veces más si no se utilizaran las instalaciones del Centro.

5) El escenario II requiere: una inversión de 5 millones de dólares, un costo de operación de un millón y medio al año y un costo de manufactura de 9.8 dólares el frasco.

6) El escenario II tiene un valor presente neto (después de 10 años de operación) de 126,700 dólares, una tasa interna de retorno de 0.5% y un tiempo de recuperación de la inversión de 9.5 años. Si se toma en cuenta la inflación (20% anual) tendremos un valor presente neto (pérdida) de 1'239,000 dólares, una tasa interna de retorno de -16.2% y un tiempo de recuperación de 19.3 años.

La tecnología del CIIGB está poco desarrollada y presenta muchos problemas técnicos. Se prevé que la tecnología se encuentre en fase industrial, por lo menos, en 5 años.

Los principales problemas son:

a) Tiene muchos pasos de proceso; el costo unitario aumenta debido a la inversión en equipo y a la baja productividad.

b) Existen 3 pasos limitantes en el desarrollo de la tecnología:

- 1) Rompimiento: se pierde 25% del producto.
- 2) Cianogenólisis: existe peligro de envenenamiento con cido cianhídrico. El costo por materias primas (CNBr) y seguridad es muy alto. Se pierde el 10% del producto.
- 3) Asociación: conversión baja (60%); se pierde más del 100% de la cadena A durante la reacción. El costo del DTT es muy alto.

c) La Productividad es muy baja. Se necesita hacer lo siguiente:

- 1) Aumentar la concentración de biomasa final de la fermentación a más de 40 g/l
- 2) Aumentar la conversión de la reacción de asociación.

d) No se tiene la suficiente información en los procesos de separación. Se necesita obtener la siguiente información experimental :

1) Propiedades físicas y químicas de las proteínas híbridas y de las cadenas incluyendo la constante de inactivación térmica y poder conocer así el límite máximo de temperatura al cual se pueden manejar los peptidos.

2) Estequiometria y cinética de las reacciones de cianogenólisis, sulfitólisis y de asociación

3) Propiedades del sistema de precipitación de la insulina ( condiciones de equilibrio ).

4) Parámetros físicos de la liofilización como el área requerida para el secado, el tiempo necesario, y la cantidad de disolvente que es necesario eliminar. En la centrifugación el área de clarificación para poder realizar un escalamiento más preciso.

e) Optimizar el uso de reactivos : se utilizan dos agentes caotrópicos ( urea y cloruro de guanidinio ). Si no se utilizará cloruro de guanidinio se podría eliminar un paso en el proceso.

Se deben de tomar en cuenta los siguientes aspectos :

1) Debido al alto costo de los equipos y la gran cantidad de pasos se deben buscar alternativas de compra o sustitución de equipo.

a) Proveer la construcción y compra de fermentadores hechos en México.

b) Evaluar la posibilidad de realizar el proceso en colaboración con otra planta ( maquilación ).

2) Debido a la complejidad del proceso se debe de integrar un grupo interdisciplinario de trabajo que incluya las siguientes partes:

a) Un grupo de laboratorio : que se dedique exclusivamente a labores de ingeniería genética y separación a nivel laboratorio.

b) Un grupo de desarrollo : que se encargue de evaluar nuevas alternativas para el desarrollo de la tecnología así como establecer contactos con los diabetólogos y funcionarios del sector salud.

c) Un grupo de ingeniería : que se encargue del escalamiento y optimización de la tecnología en planta piloto.

d) Un coordinador : que se encargue de integrar el proyecto. El equipo de coordinación estaría integrado por elementos de todos los demás grupos.

3) Consideramos que se tiene que seguir adelante con el proyecto a nivel planta piloto porque ya se tiene la experiencia en laboratorio y se integraría la planta actual del centro para investigación y producción (pruebas clínicas) pudiéndose abarcar todas las áreas del proceso. Para continuar el proceso se debe integrar el grupo interdisciplinario y se debe trabajar en laboratorio optimizando la tecnología antes de escalarla.

## A P E N D I C E I

### GLOSARIO DE TERMINOS USADOS EN INGENIERIA GENETICA

- Clona :** Grupo de células idénticas, derivadas de un ancestro común.
- Clonar :** Proceso de creación de un grupo de células idénticas, derivadas de un ancestro común. También la inserción de una fragmento de DNA en un vehículo molecular y su posterior inserción en la célula..
- DNA :** Acido desoxirribonucleico. Polímero de gran tamaño formado por nucleótidos, cuyo ordenamiento especifica las instrucciones genéticas de la célula.
- Endonucleasas :** Enzimas que rompen segmentos de DNA en ciertas regiones especificas.
- Fenotipo :** Expresión observable de las características que confiere el material genético en un organismo.
- Gene :** Segmento de DNA que contiene información especifica.
- Gene híbrido :** Gen producido mediante segmentos de DNA provenientes de distintas especies.
- Genoma :** Conjunto total de material genético contenido en una célula.
- Nucleótido :** Monómero que forma el DNA. Formado por una base (Adenina, Guanina, Citosina, Timina en DNA y Uracilo en RNA), un azúcar (ribosa en RNA y 2-desoxirribose en DNA) y un grupo fosfato.
- Plásmido :** Molécula circular de DNA que se replica independientemente en el citoplasma de ciertas células. Algunos plásmidos se utilizan como vehículos moleculares para la clonación de DNA.
- Promotor :** Región de una molécula de DNA en la cuál se enlaza una enzima llamada RNAPolimerasa e inicia la transcripción.
- Operón :** Grupo de genes contiguos relacionados en sus funciones.
- RNA :** Acido ribonucleico. Polímero formado por nucleótidos y que sirve como intermediario durante la síntesis de las proteínas a partir de la información contenida en el DNA.
- Transcripción :** Proceso en el cuál se forma, a partir de la información contenida en un gen, una molécula de RNA. A partir de esto se inicia la expresión del gen.

**Técnicas de DNA recombinante (rDNA) :** Procedimientos que permiten la manipulación del DNA in vitro.

**Triplete o codón :** Grupo de tres nucleótidos contiguos y contenidos en un gen que define un aminoácido específico. Así un ordenamiento lineal de tripletas define el ordenamiento lineal de una proteína.

## A P E N D I C E II

Cálculo de la potencia requerida en el fermentador:

Para conocer la potencia requerida se siguió el siguiente procedimiento (ver figura 1):

Suponiendo un valor de tasa de consumo específico de oxígeno ( $QO_2$ ) y conociendo la concentración final de biomasa ( $X_f$ ), podemos conocer la demanda de oxígeno:

$$\text{Demanda de oxígeno} = QO_2 \cdot X_f$$

Se utilizaron los siguientes valores:  $QO_2$  de 7.8 mMoles  $O_2/g$ -celula hr, obtenido por el grupo de laboratorio y  $X_f = 20$  g/l.

Conociendo la diferencia de concentraciones de  $O_2$  en el medio, es decir entre la solubilidad del oxígeno a una T y P determinada ( $C^*$ ) y la concentración crítica ( $C_{crit}$ ), así como la demanda de oxígeno podemos conocer el valor de la constante de transferencia  $Kla$ :

$$Kla = \text{Demanda de oxígeno} / (C^* - C_{crit})$$

Con el valor de  $Kla$  es posible conocer la potencia por unidad de volumen con una correlación empírica para el tipo de impulsor que se este utilizando. Para turbina de 6 impulsores:

$$Kla = 0.024 \cdot (P/V)^{0.4} \cdot V_s^{0.5} \quad (\text{Moo-Young (6)})$$

$$P/V (W/m^3), V_s (m/s), Kla (s^{-1})$$

Para conocer la velocidad superficial ( $V_s$ ) del gas es necesario suponer un flujo de gas y dividirlo entre la sección transversal del tanque. Para elegir el flujo de gas se graficó la ecuación de  $Kla$  en la figura 2 en un rango de flujos de 0.1 a 1.4 vvm. De esta gráfica se eligió el valor de 1 vvm ya que el valor del  $P/V$  resultante cae dentro del rango aceptable según Quintero (4), lo que no sucede con el valor de 0.5 donde la potencia requerida es muy alta y con el de 1.4 donde flujo de gas es más grande y sin embargo el decremento de potencia es muy pequeño.

Conociendo entonces la potencia por unidad de volumen o simplemente la potencia aerada se puede entonces conocer la potencia no aerada mediante la ecuación reportada por Michel y Miller (28).

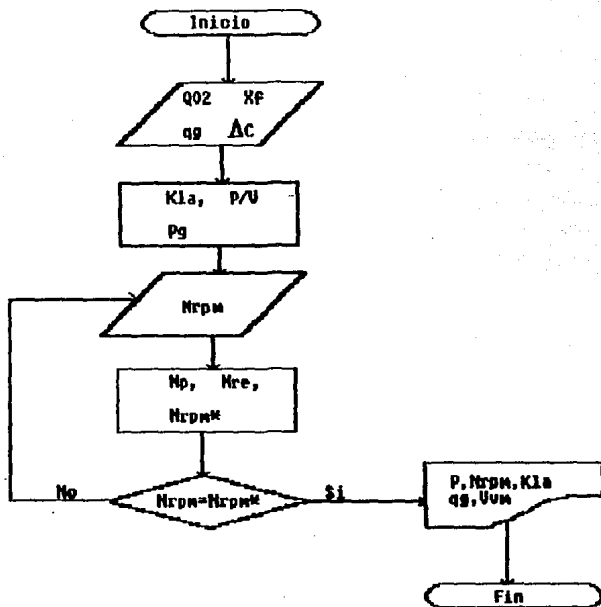
$$P_g = 0.08 \cdot (P_o^2 \cdot N^3 \cdot D^3 / Q)^{0.56}$$

$P_o$  = potencia no aerada en Hp,  $P_g$  = potencia aerada (Hp),  
 $N$  = rpm,  $Q$  = flujo de aire (ft<sup>3</sup>/min),  $D$  = Diámetro del impulsor (ft)

Teniendo entonces la potencia aerada y la no aerada es posible obtener las RPM necesarias calculando el número de potencia y el Re.

Figura 1

Diagrama de flujo del programa para calcular la potencia de un fermentador.





Kla en función de la aereación  
( Moo-Young y Blanch 1981)

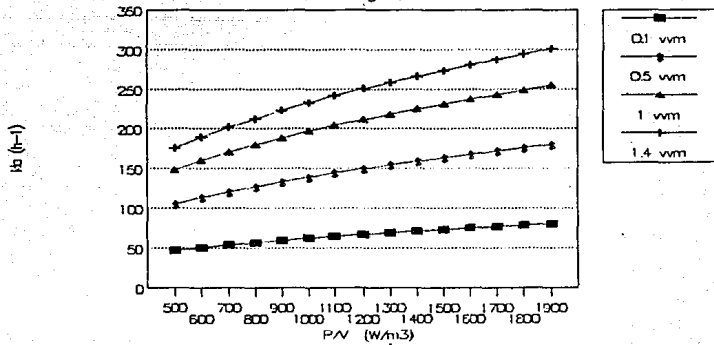


Figura 2

Este cálculo se vuelve iterativo debido a que la potencia no aerada se encuentra en los dos números adimensionales. Para las propiedades del medio se utilizaron las del agua a la misma presión y temperatura.

En el caso de los fermentadores de 2800 litros lo que se hizo fué escalar el valor obtenido de  $P/V$  para el caso de 350 litros y calcular así, con el mismo valor de  $K_{La}$ , el flujo de aire.

Nota: las referencias son las utilizadas en el capítulo III.

A P E N D I C E    III  
Esterilización

Esterilización del medio de cultivo.

La esterilización por lotes se compone de tres fases, en cada una hay destrucción de microorganismos.

Las tres fases son: calentamiento hasta una temperatura adecuada, mantenimiento a esta temperatura, y enfriamiento.

La ecuación que rige la fase de calentamiento en un sistema por lotes es:

$$\ln(n/n_0) = \int k dt = \int k_0 \exp(-E_d/RT) dt \quad (A)$$

en donde  $k_0$  y  $E_d$ , constante de muerte térmica y energía de activación, respectivamente. Son parámetros que van a depender del microorganismo que se tome como referencia. Comúnmente el microorganismo que se utiliza como referencia es *Bacillus Stereothermophilus*, por ser un microorganismo que sobrevive a muy altas temperaturas. En nuestro caso se tomó este microorganismo para asegurar una buena efectividad de esterilización.

En este proceso la temperatura es función del tiempo. Esta funcionalidad va a depender del modo en que se caliente, se mantenga y se enfríe.

Calentamiento:

Si es por:

Inyección de vapor, la relación es de la siguiente forma:

$$T = T_0(1 + a^*t / (1 + b^*t))$$

$$a^* = h^*s / (M^*T_0^*\rho^*C) \quad \text{y} \quad b^* = s/M$$

Por vapor (Chaqueta o intercambiador):

$$T = T_n(1 + b^*\exp(-a^*t))$$

$$a^* = U^*A / (M^*C) \quad \text{y} \quad b^* = (T_0 - T_n) / T_n$$

Por calentamiento eléctrico:

$$T = T_0(1 + at)$$

$$a^* = q / (M^*T_0^*\rho^*C).$$

$h$ =diferencia de entalpía entre el vapor inyectado y el medio.

$s$ =flujo másico de vapor inyectado.

$\rho$ =densidad del medio.

$C$ =capacidad calorífica de medio.

$M$ =Masa inicial de medio.

$q$ =tasa de transferencia de calor.

To=temperatura inicial del medio.

U=coeficiente global de transferencia de calor.

A=area de intercambio de calor en el caso de la camisa.

Tn=temperatura del medio de calentamiento.

Para enfriamiento, solo se utiliza agua por la camisa. Y para mantenimiento la temperatura no varía con el tiempo.

Para conocer el grado de esterilización de un proceso se tiene que sustituir estas funcionalidades en la ecuación A e integrar.

Para resolver la ecuación se pueden aplicar dos soluciones; aproximando la integral por el método de Simpson, o encontrando la solución analítica. Las soluciones analíticas tienen las siguiente formas:

Hiperbólica (inyección de vapor):

$$\ln n_f/n_o = k_d \cdot a \cdot (E_d/RT_o) / (a+b)^2 \cdot \exp(-E_d/RT_o) \cdot (b/(a+b)) \\ + (E_2 \int E_d/RT_o \cdot ((1+b \cdot t_f)/(1+(a+b) \cdot t_f - b/(a+b) \cdot t_f)) \cdot dt \\ - E_2 \int E_d/RT_o \cdot a/(a+b) \cdot dt)$$

Lineal (calentamiento eléctrico):

$$\ln n_f/n_o = k_d \cdot E_d/RT_o/a \cdot (E_2 \int E_d/RT_o \cdot ((1+a \cdot t_f) \cdot dt - E_2 \int E_d/RT_o \cdot dt)$$

Exponencial (intercambiador/camisa):

$$\ln n_f/n_o = k_d/a \cdot (E_1 \int E_d/RTh \cdot (1+b) \cdot dt - E_1 \int E_d/RTh \cdot (1+b \cdot \exp(-a \cdot t_f)) \cdot dt \\ - k_d/a \cdot \exp(-E_d/RTh) \cdot (-E_1 \int E_d/RTh \cdot b/(1+b) \cdot dt \\ + E_1 \int E_d/RTh \cdot b \cdot \exp(-a \cdot t_f) / (1+b \cdot \exp(-a \cdot t_f)) \cdot dt)$$

donde  $E_n \int \dots = \int (z, \omega) \exp(-w) / W^n \cdot dz$

Esta integral se puede resolver fácilmente por polinomios de Gauss-Laguerre.

$$E_n \int \dots = \exp(-Z) \cdot \sum_{i=0}^n (1, n) A_i \cdot (X_i + Z)^{-n}$$

Para la segunda fase de esterilización, en donde la temperatura deberá mantenerse constante se puede integrar la ecuación de la siguiente manera:

$$\ln(n_f/n_o) = -k_d \cdot t \cdot \exp(-E_d/RT)$$

Para la última fase, donde es necesario el enfriar el medio hasta la temperatura a la cuál se va a llevar a cabo la fermentación, el tiempo necesario para enfriar y la cantidad de microorganismos que pueden ser destruidos es calculado con la misma ecuación. En esta la temperatura vuelve a ser función del tiempo. La funcionalidad, utilizando un fluido refrigerante, es de la forma:

$$T = T_{e0} \cdot (1+b \cdot \exp(-a \cdot t))$$

donde  $a = W \cdot C' \cdot (1 - \exp(-U \cdot A / (W \cdot C')))$  y  $b = (T_o - T_{e0}) / T_{e0}$

$T_{e0}$  = Temperatura de entrada medio refrigerante.

$W$  = flujo másico de medio refrigerante.

$C'$  = capacidad calorífica del medio refrigerante.

Se muestran a continuación los resultados graficados de la integración de la ecuación A con los diferentes modos de calentamiento, el modo de enfriamiento y el de mantenimiento (figuras 1, 2, 3 y 4).

## Calentamiento Batch vapor en la camisa

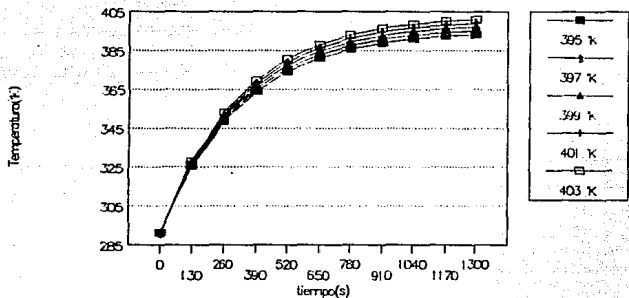


Figura 1

## Enfriamiento Batch agua en la camisa

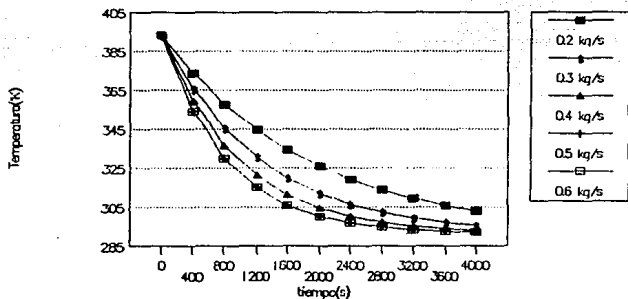


Figura 2

## Tiempo de esterilización diferentes temperaturas (mantenimiento)

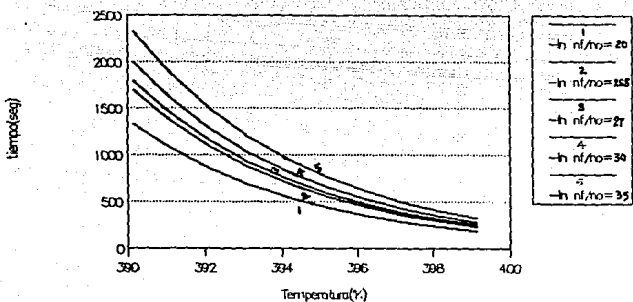
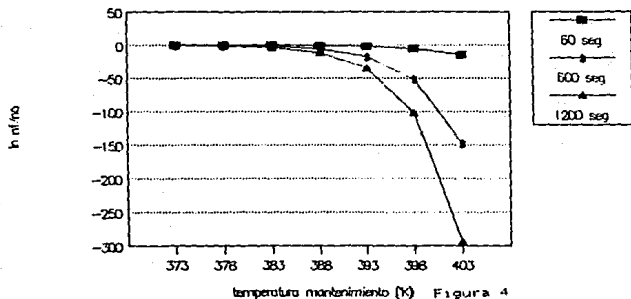


Figura 3

## Muerte termica durante el mantenimiento Bacillus Stearotemophilus



temperatura mantenimiento (°C) Figura 4

### Calor generado durante la fermentación:

Durante la fermentación se va a generar calor debido a dos causas principales, uno es el generado por el metabolismo de los microorganismos y el otro por la agitación mecánica y la expansión del aire al ser burbujeado en el medio de cultivo.  $Q_g = Q_{met} + Q_{mec}$ . El calor generado es proporcional a la tasa de rendimiento de oxígeno (Bailey(1)). Las tasas de rendimiento de oxígeno para E.Coli van de 10.8 mmolO<sub>2</sub>/gcel-h (Quintero(4)) a 2.6 mmolO<sub>2</sub>/gcel-h (Da Silva (18)), datos experimentales indican que para esta cepa el rendimiento es de 7.8 (Gosset, (63)).  $Q_{met} = 127 \text{ kcal/molO}_2 \cdot Q_{O_2} = 19.812 \text{ kcal/l-h}$ . El calor mecánico para valores de P/V entre 0.5 y 2.5 Hp/gal va de 10 a 60 BTU/gal-h (Moo-Young (6)). Podemos tomar valores diferentes para cada proyecto, ya que los P/V son diferentes, para el Escenario I (350 lts) el  $Q_{mec}$  es aproximadamente de 2.3 kcal/h-l y para el Escenario II (2800 lts) es aproximadamente 0.66 kcal/h-l. Esto nos da los siguientes calores generados:

Escenario I:  $Q_g = 7747 \text{ kcal/h}$

Escenario II:  $Q_g = 57,330 \text{ kcal/h}$

Para eliminar este calor se tiene que ver a que temperatura saldrá el agua y si el área de intercambio de la chaqueta es suficiente para obtener temperaturas de salida y flujos de agua razonables. Si  $Q_g = U \cdot A \cdot \Delta T_{lm} = m \cdot C_p \cdot \Delta t$ ,  $U = 538 \text{ kcal/h-m}^2\text{-k}^\circ$  (6,11), y la temperatura del medio es de 37°C, entonces:

Tabla 1

Volúmen	Area	$Q_g$	$T_{sal}$	$\Delta T_{lm}$	Flujo agua
(l)	(m <sup>2</sup> )	(kcal/h)	(°C)	(°C)	(Kg/h)
350	2.4195	7747	36	5.95	428
2800	9.6780	57330	31.35	11.01	4294

La temperatura máxima permisible para eliminar el agua de desecho en el desagüe es de 35°C. De aquí podemos ver que para el de 350 lts hay que aumentar el flujo para obtener una temperatura menor. Digamos que 32°C es razonable, esto nos daría un flujo de 553 Kg/h.

Para el fermentador de 2800 lts es necesario aumentar el área, porque los flujos de agua son grandes. Por tratarse de una planta situada en Cuernavaca donde el agua no es abundante, el manejo adecuado



T a b l a 2

Tferm. (°C)	Area (m2) H/D=3	U kcal/hm2C	Diam. serpentín (m)	
37	10.9138	684.65	0.0254	0.0127
Qg (kcal/h)	H/D=2			
57330	9.678			

Tsalida agua = 30

Flujo (kg/h)	Area(m2) necesaria	Numero de vueltas			
		Tanque (3/1)		Tanque (2/1)	
		Dserp 1 "	Dserp 1/2 "	Dserp 1 "	Dserp 1/2 "
8000	4.161054	*****			
5000	6.637687				
4750	7.008092				
4500	7.39743				
4250	7.832573	NO SE REQUIERE AREA EXTRA			
4000	8.322109				
3750	8.876916				
3500	9.510982	*****			
3250	10.2426	*****		2.0647	4.129399
3000	11.09615	0.769059	1.538118	5.18609	10.37218

de ésta es importante. Se puede aumentar el área poniendo un serpentín sumergido dentro del fermentador. Es preferible tener un mayor área, que también será usada para esterilizar, o en otro tipo de fermentaciones en las cuales el calor generado sea mayor.

Si fijamos la temperatura de salida del agua en 30°C. Podemos calcular para diferentes flujos el área que sería necesaria para mantener el fermentador a la temperatura deseada. De la tabla 2 podemos ver que el flujo puede disminuir bastante si aumentamos el área de intercambio. Se escogió un flujo de 3000 Kg/h, un tanque de H/D=2, para un área de 11.09 m<sup>2</sup>. Se requieren 5.17/10.37 vueltas de serpentín (Diámetros de 1"1/2").

### Esterilización de aire:

El aire por lo general, solo se requiere filtrar. Existen dos clases principales de filtros que se han usado. Los filtros de fibra de vidrio y los de membrana. Aunque los primeros ya casi han desaparecido. Los filtros de membrana se escogen por catálogo o por reportes en la revistas. Para diseñar los filtros de fibra de vidrio se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} -\log(1-\eta) &= 1.373 \cdot L^{0.9} \cdot V^{-0.42} && \text{para } V \text{ de } 6-60 \text{ ft/min} \\ -\log(1-\eta) &= 1.351 \cdot 10^{-5} \cdot L^{0.9} \cdot V^{2.03} && \text{para } V \text{ de } 120-600 \text{ ft/min} \\ \Delta P &= 9.257 \cdot 10^{-6} \cdot V \cdot (1-\epsilon)^m \cdot \mu \cdot L / df^2 && m=1.35 \text{ para } df=19\mu\text{m} \\ &&& m=1.55 \text{ para } df=8\mu\text{m} \end{aligned}$$

donde:

$-\log(1-\eta)$  = retención de microorganismos  
L = longitud del filtro en pulgadas  
V = velocidad del aire en ft/min  
 $\Delta P$  = caída de presión a través del filtro  
 $\epsilon$  = fracción vacía del filtro  
 $\mu$  = densidad del aire  
df = diámetro de la fibra.

Para membranas, un criterio importante es que para cartuchos de 10" el flujo óptimo de aire es de 60 scfm.

A continuación se mostrarán, primero para fibra de vidrio y luego para membranas, las gráficas que sirven para diseñar o escoger un filtro adecuado (figuras 5, 6 y 7).

## Longitud de filtro fibra 8 micras

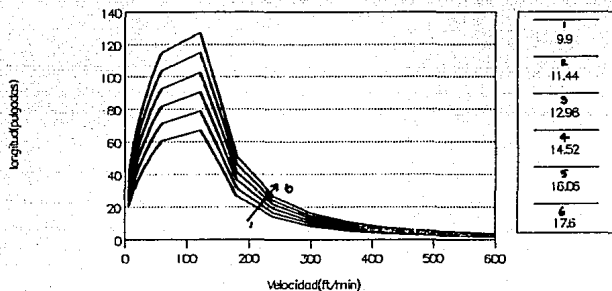


Figura 5

## Caída de Presión a través del filtro fibra 8 micras

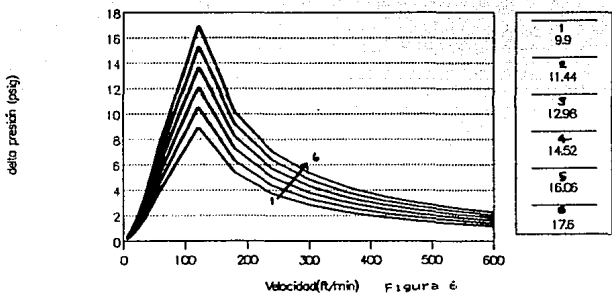
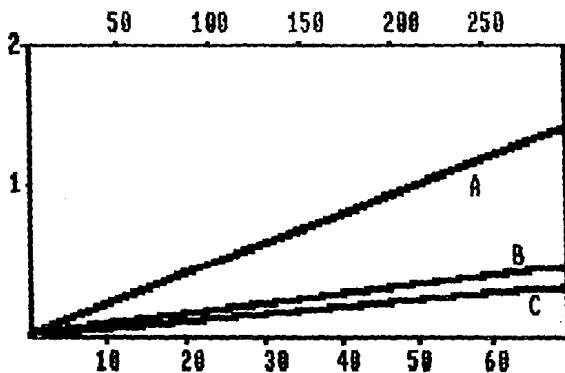


Figura 6

Figura 7 Filtros de membrana

flujo de vapor (libras/hora)



Flujo de aire SCFM (cartucho 10")  
elemento EMFLON (catálogo comercial)

- A: Aire a 1 PSIG presión de entrada
- B: Aire a 30 PSIG presión de entrada
- C: Vapor a 30 PSIG presión de entrada