

**DESARROLLO DE UN PROTOTIPO SIMULADOR
DEL TRACTO GASTROINTESTINAL MEDIANTE
REACTORES QUÍMICOS AUTOMATIZADOS**

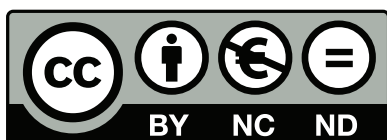
Tesis Doctoral

Ernesto Rivas Montoya

Málaga, 2014

AUTOR: Ernesto Rivas Montoya

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



**Programa de Doctorado: Química Avanzada.
Preparación y Caracterización de Materiales.**

**Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga**

***DESARROLLO DE UN PROTOTIPO SIMULADOR DEL
TRACTO GASTROINTESTINAL MEDIANTE REACTORES
QUÍMICOS AUTOMATIZADOS***

Tesis Doctoral

Presentada por:

Ernesto Rivas Montoya

Dirigida por:

**Dr. Antonio Martínez Férez
Dr. Juan Manuel López Romero**

Málaga, Octubre de 2014

JUAN MANUEL LÓPEZ ROMERO, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ANTONIO MARTÍNEZ FÉREZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**DESARROLLO DE UN PROTOTIPO SIMULADOR DEL TRACTO GASTROINTESTINAL MEDIANTE REACTORES QUÍMICOS AUTOMATIZADOS**” constituye la Memoria de Tesis Doctoral de D. ERNESTO RIVAS MONTOYA, que ha sido realizada en parte en el laboratorio de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, bajo nuestra dirección y cuya presentación autorizamos en Málaga, a 30 de Octubre de 2014

Fdo. Dr. Juan Manuel López Romero

Fdo. Dr. Antonio Martínez Férez

*A José y Maravillas,
que me dieron la vida.*

*A Anabel y Regina,
que me dieron la luz.*

Agradecimientos

Una simple línea de agradecimientos resulta injusta e insuficiente para saldar la deuda contraída con mis directores de Tesis. Este trabajo habría sido imposible sin el empuje y apoyo que recibí en todo momento de Antonio Martínez Férez y Juan Manuel López Romero, a quienes debo gratitud por los múltiples conocimientos aprendidos y por la mucha paciencia que han gastado conmigo. Es también sincero mi agradecimiento a los dos directores del Departamento de Tecnología Electrónica, mi Departamento, que se han sucedido en el tiempo que ha durado mi trabajo de investigación. Pese a compartir mi dedicación con otras áreas de conocimiento ajenas al Departamento, tanto Fabián Arrebola Pérez como Gonzalo Joya Caparrós me han alentado en todo momento en mi camino hacia la consecución del doctorado.

Pido perdón a Anabel y Regina, por todo el tiempo que no les he dedicado.

Muchas gracias a Fco. David Trujillo, Ana Pozo y Alicia Triviño, que me han ofrecido un apoyo incondicional en todo momento. No lo saben, pero me han ayudado mucho más de lo que se imaginan.

Gracias a mis compañeros de departamento en general, y a los “politécnicos” en particular, a quienes pido disculpas si no los nombro uno a uno.

Mi agradecimiento a Marta Escolar, que siempre ha sabido explicar mi trabajo a los demás mejor que yo mismo.

Gracias a mis “compis” del laboratorio de Granada: Javi, Mariló, con la que ya dejaré de disputarme la garrafa de milliQ, y mi tocayo Ernesto.

PRÓLOGO

La elaboración y redacción de todo trabajo científico multidisciplinar implica un esfuerzo adicional, por cuanto que la documentación generada debe ser comprensible por lectores especializados en diferentes campos de investigación. Es el caso del presente trabajo, centrado en el desarrollo e implementación de un sistema (que exige conocimientos de ingeniería electrónica) que simula partes del sistema digestivo humano (implica nociones básicas de fisiología humana, en el ámbito de la medicina) enfocado a estudios de encapsulación y liberación de principios activos (aplicaciones farmacéuticas que requieren de conocimientos sobre bioquímica). Todo ello haciendo uso de instalaciones y recursos de un laboratorio de Ingeniería Química.

En un intento de hacer la lectura de esta Tesis Doctoral accesible al amplio abanico de interlocutores posibles, el autor pide disculpas de antemano si en alguna de las áreas de conocimiento citadas la redacción de la memoria ha resultado inconexa, insuficiente o excesiva.

Estructura de la Memoria:

El capítulo 1, *Introducción*, justifica el empleo de modelos para la simulación *in vitro* del funcionamiento de diferentes partes del cuerpo humano, así como la conveniencia de automatizar dichas simulaciones. En este capítulo se realiza una descripción de los fundamentos básicos del sistema digestivo necesaria para poder entender mejor los mecanismos a simular, haciendo hincapié en aquellos aspectos que resultan útiles para definir los parámetros físicos y químicos que identifican los requisitos a cumplir por el sistema que se pretende desarrollar.

En el capítulo 2 se formulan los *Objetivos* que se pretenden alcanzar con la realización de esta Tesis Doctoral.

En el capítulo 3, *Antecedentes*, se exponen los principales modelos existentes relacionados con la simulación de procesos digestivos, que han servido de referencia para desarrollar el prototipo propuesto.

En el capítulo 4, *Equipamiento y reactivos*, se describen los recursos disponibles para la realización del prototipo simulador del tracto gastro-intestinal y las principales materias primas que van a ser objeto de estudio durante los ensayos.

El quinto capítulo, *Resultados*, se divide en tres partes. En la primera parte se plantea la arquitectura del sistema, los subsistemas que la componen y el uso que se hace del equipamiento disponible, para seguidamente describir el desarrollo tanto hardware como software. En una segunda parte se describen las medidas, pruebas y ensayos realizados con el objeto de verificar el buen funcionamiento del prototipo desarrollado. En la tercera parte se detallan los ensayos relacionados con las aplicaciones del sistema. Si bien son múltiples los campos de investigación en los que resulta útil la simulación *in vitro*, en los ensayos realizados se han priorizado aplicaciones relacionadas con la efectividad de la micro/nanoencapsulación de principios activos, por ser este un ámbito de investigación de gran relevancia en la actualidad y en el que los métodos de estudio *in vitro* resultan de gran aplicación.

En el capítulo 6 se enumeran las *Conclusiones* de esta Tesis Doctoral.

En el capítulo 7, *Líneas Futuras*, se proponen mejoras en el prototipo simulador del tracto gastrointestinal así como otros métodos de ensayos y análisis de resultados.

Para facilitar el acceso a las referencias, en el capítulo 8, *Bibliografía*, se han diferenciado las referencias bibliográficas de libros, tesis y publicaciones científicas de otras consultas bibliográficas tales como páginas web o manuales de usuario de recursos empleados.

Se ha estimado oportuno incorporar varios *Anexos* a esta Memoria.

- Un *glosario* de términos y acrónimos, útil y necesario dado el carácter multidisciplinar de este trabajo.
- Información más detallada de cómo se han realizado las *Comunicaciones* entre los diferentes subsistemas.

- Información complementaria sobre *algoritmos de regulación* que son referenciados en la Memoria.
- *Manuales de usuario* de los programas desarrollados.
- Informes y resultados de análisis químicos realizados

El autor ha contado con el inestimable apoyo del grupo de investigación de *Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos* de la Universidad de Granada, el grupo de investigación de *Nanotecnología y Síntesis Orgánica* de la Universidad de Málaga, y el *Departamento de Tecnología Electrónica* de la Universidad de Málaga.

La elaboración de esta Tesis Doctoral se ha compaginado con la actividad profesional de *Técnico de Grado Medio de apoyo a Docencia e Investigación* en el Departamento de Tecnología Electrónica de la Universidad de Málaga y la participación del autor en diferentes ámbitos de gestión universitaria de la Universidad de Málaga (Comité de Empresa, Claustro, Grupo de Mejora de la Calidad de los Servicios y Comisión de infraestructuras del Departamento de Tecnología Electrónica).

ÍNDICE

Contenido

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO SIMULADOR DEL TRACTO GASTROINTESTINAL MEDIANTE REACTORES QUÍMICOS AUTOMATIZADOS

PRÓLOGO	ii
ÍNDICE	v
Contenido	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xiii
RESUMEN	xv
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 FUNDAMENTOS FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DIGESTIVO HUMANO	5
1.1.1 LA BOCA Y EL ESÓFAGO	6
1.1.2 EL ESTÓMAGO	7
1.1.3 EL DUODENO	7
1.1.4 EL INTESTINO DELGADO (YEYUNO E ÍLEON)	8
1.1.5 EL INTESTINO GRUESO	9
1.2 SIMULACIÓN DE LAS DISTINTAS PARTES QUE CONFORMAN EL SISTEMA DIGESTIVO	10
1.2.1 SIMULACIÓN DE LA BOCA	10
1.2.2 SIMULACIÓN DEL ESTÓMAGO	10
1.2.3 SIMULACIÓN DEL DUODENO	12
1.2.4 SIMULACIÓN DEL INTESTINO DELGADO	12
1.2.5 SIMULACIÓN DEL INTESTINO GRUESO	13
2 OBJETIVOS	15
3 ANTECEDENTES	17
3.1 SIMULADOR DEL ECOSISTEMA MICROBIANO INTESTINAL HUMANO (SHIME)	17
3.2 MODELO GASTROINTESTINAL TIM	20
3.3 MODELO DINÁMICO PARA EL ESTUDIO DE PROBIÓTICOS	23
3.4 DIGESTOR DINÁMICO IN VITRO	24
3.5 SIMULADOR SIMPLE DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	26
4 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS	29
4.1 EQUIPAMIENTO	29
4.1.1 REACTOR TIPO TANQUE AGITADO	30
4.1.2 ELECTRODO DE pH	32
4.1.3 MÓDULO TUBULAR DE MEMBRANA	33
4.1.4 MEMBRANAS CERÁMICAS	34
4.1.5 BOMBAS PERISTÁLTICAS	34
4.1.6 BALANZA DE PRECISIÓN	35
4.1.7 SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS	35
4.1.8 ESPECTROFOTÓMETRO HELIOS-GAMMA	38
4.1.9 ENTORNO DE PROGRAMACIÓN	39
4.1.10 EQUIPOS COMPLEMENTARIOS	40

4.2	REACTIVOS	42
4.2.1	REACTIVOS USADOS PARA LA SIMULACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.	42
4.2.2	REACTIVOS USADOS PARA LA PREPARACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS LIPÍDICAS.	43
4.2.3	OTROS REACTIVOS	45
5	RESULTADOS	47
5.1	DESARROLLO	47
5.1.1	CONSIDERACIONES PREVIAS	48
5.1.2	ARQUITECTURA	51
5.1.3	SUBSISTEMA DE CONTROL DE pH	52
5.1.4	SUBSISTEMA DE MEDIDA DE PRESIÓN	58
5.1.5	CONEXIONES DEL ELEMENTO DE FILTRACIÓN	65
5.1.6	CONTROL DE CAUDAL.....	66
5.1.7	CONTROL DE PRESIÓN	67
5.1.8	DESARROLLO SOFTWARE.....	70
5.1.9	FICHERO DE CONFIGURACIÓN.....	70
5.1.10	FICHERO DE DATOS	72
5.1.11	MEDIR Y REGISTRAR VALOR DE pH	74
5.1.12	REGULAR pH DOSIFICANDO ÁCIDO O BASE	75
5.1.13	MEDIR Y REGISTRAR VALOR DE PRESIÓN	79
5.1.14	DOSIFICAR OTROS REACTIVOS.....	80
5.1.15	MEDIR Y REGISTRAR VALOR DE PESO.....	81
5.1.16	PROGRAMAS DESARROLLADOS	82
5.2	FUNCIONAMIENTO	91
5.2.1	MEDIDAS REALIZADAS Y RANGO DE PARÁMETROS	91
5.2.2	PRUEBAS DE USUARIO	93
5.2.3	MEDIDA DE pH	94
5.2.4	RELACIÓN ENTRE VARIACIONES DE PRESIÓN Y ABSORCIÓN.....	97
5.2.5	CONTROL DE PRESIÓN	98
5.2.6	SIMULACIÓN GASTRODUODENAL.....	101
5.3	APLICACIONES	104
5.3.1	ESTUDIO DEL PUNTO DE LIBERACIÓN DE CÁPSULAS BLANDAS	104
5.3.2	ENSAYOS CON EMULSIONES ALIMENTARIAS.	110
5.3.3	ENSAYOS CON COLORANTES.....	115
5.3.4	ENSAYOS CON NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	118
5.3.5	ENSAYOS CON ANTIOXIDANTES	128
6	CONCLUSIONES	133
7	LÍNEAS FUTURAS.....	136
7.1	DESARROLLO DE MEJORAS	136
7.1.1	SISTEMA DE CALEFACCIÓN PARA MÓDULO TUBULAR	136
7.1.2	INSERTAR MEDIDAS DEL ESPECTROFOTÓMETRO EN EL PROCESO DE AUTOMATIZACIÓN.....	137
7.1.3	INCREMENTAR EL NÚMERO DE ACTUADORES.	138
7.1.4	REGULAR CAUDALES EN BASE AL CAUDAL MÁSSICO DE PRODUCTO FILTRADO.....	138
7.2	NUEVOS ENSAYOS	140
7.2.1	BIODISPONIBILIDAD DE PACLITAXEL	140
7.2.2	BIODISPONIBILIDAD DE LÍPIDOS	140
7.2.3	ENSAYOS DE PROBIÓTICOS	140
7.2.4	ENSAYOS DE SIMULACIÓN QUE INCOPOREN LA FLORA BACTERIANA	141

8	BIBLIOGRAFÍA y REFERENCIAS	143
8.1	BIBLIOGRAFÍA.....	143
8.2	PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	145
8.3	PATENTES.....	152
8.4	OTROS DOCUMENTOS Y REFERENCIAS WEB.	153
9	ANEXOS	165
	ANEXO I: GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ACRÓNIMOS	166
	ANEXO II: COMUNICACIONES: INTERFACES Y CONEXIONES	170
	II.1 ANÁLISIS DE COMUNICACIONES POR EL BUS RS-422.....	170
	II.2 INTERFAZ CON SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS	174
	II.3 INTERFAZ CON BALANZA <i>SARTORIUS-QUINTIX</i>	177
	II.4 CONEXIONES	179
	ANEXO III: ALGORITMOS DE REGULACIÓN	181
	III.1 ALGORITMO <i>PID</i>	182
	III.2 CONTROL DIFUSO PARA REGULAR LA PRESIÓN	183
	ANEXO IV: MANUALES DE USUARIO DE LOS PROGRAMAS DESARROLLADOS.....	186
	Programa <i>COMUNICA</i>	186
	Programa <i>COMUNICATOR</i>	187
	Programa <i>REACTORES</i>	188
	Programa <i>CALIBRApH</i>	196
	Programa <i>CALIBRAPRESION</i>	198
	Programa <i>CONVERSION</i>	201
	Programa <i>GRAFICAS</i>	203
	Programa <i>BIODIGESTOR</i>	206
	ANEXO V: INFORMES DE ANÁLISIS QUÍMICOS	213

Índice de figuras

Figura 1 El aparato digestivo humano	5
Figura 2 Diagrama del modelo SHIME	18
Figura 3 Fotografía SHIME.....	19
Figura 4 Diagrama del sistema TIM-1	20
Figura 5 Diagrama del sistema TIM-2	21
Figura 6 Fotografía de TIM-1	22
Figura 7 Modelo dinámico del tracto gastrointestinal superior.....	23
Figura 8 Digestor dinámico in vitro desarrollado por Ainia.....	25
Figura 9 Evolución de variables en un simulador del tracto gastrointestinal.....	26
Figura 10 Fotografía del reactor tanque agitado Biostat B.....	30
Figura 11 Recta de sensibilidad de electrodo de pH.....	32
Figura 12 Reactor tubular de membrana	33
Figura 13 Detalle de membrana de filtración y salida de producto filtrado.....	33
Figura 14 Bomba peristáltica MP-3	35
Figura 15 Balanza de precisión.....	35
Figura 16 Módulo de adquisición de datos i-7011	36
Figura 17 Módulo de adquisición de datos i-7017	37
Figura 18 Módulo interfaz i-7561.....	38
Figura 19 Espectrofotómetro Helios gamma.....	39
Figura 20 Compartimento de muestras del espectrofotómetro.....	39
Figura 21 Homogeneizador Silentcrusher-m.....	40
Figura 22 Triglicéridos empleados en la preparación de nanopartículas lipídicas	43
Figura 23 Estructura de L- α -Fosfatidilcolina (PC)	43
Figura 24 Estructura de macelignano	44
Figura 25 Estructura de Taxol	44
Figura 26 Estructura del β -caroteno.....	45
Figura 27 Estructura del ácido carmínico	45
Figura 28 Arquitectura del prototipo simulador del tracto gastrointestinal.....	52
Figura 29 Ejemplos de aplicación de amplificadores de muy alta impedancia de entrada para medida de pH.....	53
Figura 30 Acondicionamiento de señal para lectura de pH	54
Figura 31 PCB de acondicionamiento de electrodo de pH (pistas)	54
Figura 32 PCB de acondicionamiento de electrodo de pH (componentes)	55
Figura 33 Circuito interfaz de control de estado sólido.....	56
Figura 34 Placa interfaz de control.....	57
Figura 35 Panel posterior de la caja de control de pH.....	57
Figura 36 Sensor de presión 26PCB. Información del fabricante	58
Figura 37 Circuito acondicionador de señal de sensor de presión	60
Figura 38 Fuente de alimentación para circuito sensor de presión.....	60
Figura 39 Diagrama de conexiones del sensor de presión	61
Figura 40 Caja de interfaces y medida de presión.....	61
Figura 41 Caja de sensor de presión y amplificador	62
Figura 42 Placa de sensor de presión	63
Figura 43 Placa base de interfaces y medida de presión	63
Figura 44 Conexiones de la caja de interfaces y medida de presión	64
Figura 45 Panel lateral de alimentación de la caja de interfaces y medida de presión	64
Figura 46 Reactor tubular. Entrada de impulsión y salida de filtrado	65
Figura 47 Reactor tubular. Detalle de la conexión de retorno	66
Figura 48 Ciclo de trabajo de funcionamiento de una bomba.....	66
Figura 49 Esquema general de conexiones de bombas de impulsión y retorno.....	67

Figura 50 Esquema de conexiones de bombas de impulsión y retorno. Caudal de impulsión alto	68
Figura 51 Esquema de conexiones de bombas de impulsión y retorno. Oclusión en retorno	68
Figura 52 Ciclo de trabajo de bombas de impulsión y de retorno	69
Figura 53 Algoritmo de creación y manejo de fichero de datos	74
Figura 54 Algoritmo de medir y registrar valor de pH.....	75
Figura 55 Diagramas de tiempo de regulación de pH.....	76
Figura 56 Ciclo de trabajo de bomba dosificadora de ácido o base	76
Figura 57 Cálculo del ciclo de trabajo de la bomba de ácido o base.....	77
Figura 58 Algoritmo de regulación de pH dosificando ácido o base.....	78
Figura 59 Algoritmo de medir valor de presión	79
Figura 60 Algoritmo de dosificación de reactivos	81
Figura 61 Algoritmo de comunicación con balanza	82
Figura 62 Panel de inicio del programa Comunicator v.2.....	83
Figura 63 Interfaz de usuario del programa Reactores	83
Figura 64 Interfaz de usuario del programa Calibraph.....	85
Figura 65 Interfaz de usuario del programa CALIBRAPRESION	87
Figura 66 Interfaz de usuario del programa DIGESTOR	88
Figura 67 Programa BioDigestor: Panel de regulación de pH	89
Figura 68 Programa BioDigestor: Panel de regulación de pH durante la simulación del intestino delgado.....	90
Figura 69 Programa BioDigestor: Panel de dosificación de reactivos.....	90
Figura 70 Medida de pH (1)	95
Figura 71 Medida de pH (2)	95
Figura 72 Medida de pH (3)	96
Figura 73 Medidas de presión y registro de peso (1)	97
Figura 74 Medidas de presión y registro de peso (2)	98
Figura 75 Detalle de medida de presión	100
Figura 76 Detalle de dispositivo peristáltico	100
Figura 77 Representación de medidas de presión y señal promediada	101
Figura 78 Simulación de fase gastroduodenal. Representación de datos registrados	102
Figura 79 Ejemplo de cápsulas blandas	104
Figura 80 Cápsulas usadas en el ensayo.....	105
Figura 81 Detalle de colocación de web-cam.....	105
Figura 82 Evolución de pH durante el ensayo con cápsula tipo A	106
Figura 83 Fotografías de la cápsula A durante el ensayo.....	106
Figura 84 Evolución parcial de pH durante un segundo ensayo con cápsula tipo A .	107
Figura 85 Evolución de pH durante el ensayo con cápsula tipo B	107
Figura 86 Fotografías de la cápsula B durante el ensayo.....	108
Figura 87 Evolución de pH durante el ensayo con cápsula tipo C	108
Figura 88 Fotografías de la cápsula C durante el ensayo.....	109
Figura 89 Emulsión W/O/W.....	111
Figura 90 Preparación de emulsión doble W/O/W	112
Figura 91 Ensayo con emulsión alimentaria: Reactor y emulsión original	113
Figura 92 Emulsión original, muestra "digerida" y muestra filtrada	114
Figura 93 Interfaz de usuario del programa Interpolapuntos	116
Figura 94 Recta de calibración del ácido carmínico (concentración 28mg/100mL) ...	117
Figura 95 Simulación de digestión de macelignano. Fase de absorción intestinal	120
Figura 96 Simulación de digestión de NPLs de macelignano	121
Figura 97 Espectro de macelignano obtenido mediante HESI-MS.....	122
Figura 98 Cromatograma tras análisis DEP-MS del compuesto PS122.....	126
Figura 99 Espectro del compuesto PS122	127
Figura 100 Recta de calibración de β -caroteno	128

<i>Figura 101 Diluciones de β-caroteno</i>	<i>131</i>
<i>Figura 102 Sistema de calefacción para módulo tubular de filtracion</i>	<i>137</i>
<i>Figura 103 Inserción del espectrofotómetro en el proceso de automatización</i>	<i>138</i>
<i>Figura 104 Editor de control difuso de Matlab</i>	<i>139</i>
<i>Figura 105 Análisis de transferencia de datos entre ordenador y Biostat.....</i>	<i>170</i>
<i>Figura 106 Captura de pantalla del programa Comunica.....</i>	<i>171</i>
<i>Figura 107 Tipo de conectores empleados</i>	<i>179</i>
<i>Figura 108 Conexión del Bus 485</i>	<i>180</i>
<i>Figura 109 Conexión de sensor</i>	<i>180</i>
<i>Figura 110 Conexión de 24 V.....</i>	<i>180</i>
<i>Figura 111 Ejemplo de control simple</i>	<i>181</i>
<i>Figura 112 Representación esquemática de un sistema de control básico</i>	<i>181</i>
<i>Figura 113 Algoritmo de control PID</i>	<i>183</i>
<i>Figura 114 Control difuso. Editor de ficheros *.fis.....</i>	<i>184</i>
<i>Figura 115 Control difuso. Reglas de diseño.....</i>	<i>184</i>
<i>Figura 116 Conjuntos difusos y relaciones de pertenencia</i>	<i>185</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1 Membranas cerámicas usadas</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 2 Reactivos que simulan fluidos gastrointestinales</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 3 Campos del fichero de configuración.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 4 Registro de datos.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 5 Valores óptimos en el cálculo del coeficiente de una bomba peristáltica</i>	<i>85</i>
<i>Tabla 6 Rango y resolución de parámetros medidos.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 7 Observaciones realizadas por usuarios "químicos".....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 8 Observaciones realizadas por usuarios "electrónicos".....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 9 Valores de la recta de calibración del ácido carmínico</i>	<i>117</i>
<i>Tabla 10 Extracto del listado de masas HESI-MS de la muestra de macelignano (producto filtrado tras simulación gastrointestinal)</i>	<i>123</i>
<i>Tabla 11 Extracto del listado de masas HESI-MS de la muestra de NPLs de macelignano (producto filtrado tras simulación gastrointestinal).....</i>	<i>124</i>
<i>Tabla 12 Extracto del listado de masas de producto filtrado conteniendo PS122</i>	<i>127</i>
<i>Tabla 13 Valores de la recta de calibración de beta-caroteno</i>	<i>128</i>
<i>Tabla 14 Controles del sistema Biostat.....</i>	<i>172</i>
<i>Tabla 15 Valores medidos por el sistema Biostat</i>	<i>173</i>
<i>Tabla 16 Relación de comandos del módulo i-7011.....</i>	<i>175</i>
<i>Tabla 17 Relación de comandos de los módulos i-7017, i-7018</i>	<i>175</i>
<i>Tabla 18 Comandos del interfaz con balanza Sartorius</i>	<i>177</i>
<i>Tabla 19 Formato de datos recibidos de la balanza</i>	<i>179</i>

RESUMEN

RESUMEN

El prototipo descrito en esta Tesis Doctoral se emplea para realizar la simulación *in vitro* del tracto gastrointestinal. Esta simulación se lleva a cabo en las tres fases que se describen a continuación: simulación de estómago, simulación de duodeno y absorción intestinal.

Fase 1: Simulación de estómago.

El estómago se simula en un biorreactor de tanque agitado dotado de los siguientes elementos:

- Camisa de refrigeración/calefacción con agua para estabilización de temperatura, cuyo objetivo es mantener el interior del tanque en condiciones térmicas similares a las de cuerpo humano.
- Sistema de regulación de pH con una sonda de pH como elemento sensor y un subsistema de impulsión con ácido clorhídrico que simula las secreciones ácidas de las glándulas gástricas.

Se puede usar un conjunto de bombas auxiliares para dosificar otros reactivos. El contenido del biorreactor se somete a agitación mediante un sistema de turbinas movidas por un servomotor que funciona a velocidad constante y regulable.

Fase 2: Simulación de duodeno.

El postprandium se simula en el mismo biorreactor, pero reproduciendo en este caso las condiciones del quimo en el duodeno.

El sistema de regulación de pH se configura para dosificar bicarbonato de sodio, emulando la acción de los jugos pancreáticos. Un conjunto de bombas auxiliares se configura para dosificar sales biliares y otros fluidos que se consideren de interés, en función del enfoque que se quiera dar al experimento.

Fase 3: Absorción intestinal.

Para simular la absorción intestinal se hace fluir de forma controlada el contenido del biorreactor por el interior de un sistema modular de filtración que contiene membranas tubulares de tamaño de corte variable. El tamaño de corte de la membrana se elige en función del enfoque que se quiere dar al proceso de simulación.

Para regular el caudal y presión en los circuitos hidráulicos se actúa sobre un conjunto de bombas peristálticas, usando como elemento de muestra el valor medido en uno o varios sensores de presión intercalados en los conductos que comunican el tanque agitado con el sistema de filtración.

Durante el proceso de absorción aumenta la concentración del producto contenido en el tanque agitado, simulando la paulatina pérdida de agua del quimo en su avance por el intestino.

Finalmente el tanque agitado, que hace las funciones de reservorio, pasa a simular el intestino grueso. El cierre hermético del reactor permitirá realizar cultivos bacterianos que simulen la flora intestinal.

Hay un sistema de control basado en módulos de adquisición de datos y actuadores conectados a un ordenador que permite la programación, control y supervisión de todos los elementos descritos así como el registro de parámetros y variables para su posterior análisis.

1.- INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La simulación y modelado de diferentes partes del cuerpo humano ha sido una tarea estudiada por un gran número de investigadores a lo largo del tiempo. Los experimentos realizados *in vivo* se efectúan directamente sobre el organismo de un ser vivo. Este término engloba pues las pruebas con pacientes y los ensayos experimentales con animales. El término *in vitro*, por el contrario, se refiere de forma genérica a técnicas de ensayo realizadas en un laboratorio, bajo un entorno y condiciones de ambiente controlado, fuera del organismo vivo.

En la actualidad existen en la literatura modelos *in vitro* que simulan diversas etapas del proceso de digestión humana. La mayoría de ellos se basan en la puesta en contacto del alimento o compuesto bioactivo de interés con fluidos gastrointestinales simulados. De forma simultánea se simulan otras variables, tales como los movimientos peristálticos, la temperatura corporal, el desplazamiento a lo largo de todo el tracto gastrointestinal o la absorción de nutrientes. En los modelos de simulación estáticos se mantiene constante la proporcionalidad que guardan entre sí los diversos parámetros que intervienen en cada etapa de la digestión (Hur, 2011) mientras que en los modelos de simulación dinámicos varían con el tiempo parámetros tales como el pH y la concentración de los reactivos usados para simular los fluidos corporales (Mainville, 2005).

Estos modelos se han desarrollado en la mayoría de los casos para realizar:

- Estudios nutricionales, como evaluar la absorción de un alimento o testar la supervivencia de micro-organismos.
- Estudios farmacológicos para determinar el sitio de liberación de un bioingrediente encapsulado.
- Estudios de seguridad relacionados con la efectividad de un fármaco tras su modificación por la acción de los jugos gastrointestinales.

A pesar de los resultados altamente fiables que se obtienen con los estudios *in vivo*, los modelos *in vitro* son cada día más demandados para realizar ensayos durante períodos de tiempo muy prolongados y para estudiar la liberación específica de sustancias debido al ahorro de coste y tiempo que conllevan. Además, otro factor a favor de la simulación *in vitro* frente a determinados ensayos *in vivo* está determinado por las consideraciones éticas que acarrea la experimentación con animales.

Los procesos de simulación son lentos y requieren el control de varios parámetros físicos y químicos, tales como la temperatura, el pH o la concentración de reactivos. La automatización de estos procesos mediante un sistema asistido por ordenador permite al investigador una cierta autonomía y libertad de acción, de modo que no necesita permanecer atento durante todo el tiempo que dure el proceso. Mediante la implementación de aplicaciones telemáticas, de hecho, ni siquiera es estrictamente necesaria la presencia del investigador cerca del simulador, salvo determinados momentos en los que haya que reemplazar un reactivo.

Hay dificultades añadidas que requieren el uso de sistemas de control asistidos. Por ejemplo, si se desea reproducibilidad durante la aportación de caudales muy pequeños de un reactivo, que requiere la dosificación de cantidades de volumen inferior al mL en intervalos constantes de tiempo de unos pocos segundos durante muchos minutos, o la sincronización de dispositivos de bombeo para regular la presión en un conducto.

Así pues, una correcta aplicación informática permitiría al investigador atender tareas tales como:

- Automatizar procesos de medida de parámetros o adición de reactivos.
- Procesamiento de la información obtenida de los parámetros medidos, a fin de automatizar la presentación de informes, tablas o diagramas de resultados.
- Actuar *on line* sobre los parámetros que intervienen en la regulación de un determinado proceso, ya sea de modo presencial o de forma remota.
- Obtener muestras de forma automática para su análisis de forma periódica o cuando se produzcan ciertos eventos.
- Generar señales que avisen con una determinada antelación de la finalización de algún proceso de larga duración.
- Garantizar ensayos reproducibles.

En los próximos apartados, continuando este capítulo de introducción, se realiza una descripción de los fundamentos básicos del sistema digestivo con el objeto

de poder entender mejor los mecanismos a simular. Se hace hincapié en aquellos aspectos que resultan útiles para definir los parámetros físicos y químicos que identifican los requisitos que debe cumplir el prototipo simulador del tracto gastrointestinal que se pretende desarrollar. Posteriormente se resumen los métodos más relevantes que se emplean para simular el funcionamiento de los órganos que componen el sistema digestivo.

A lo largo de esta descripción y en posteriores capítulos de esta Tesis se repite el concepto de biodisponibilidad. Este término admite varias interpretaciones según el contexto en el que se emplea. En farmacología la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral hace referencia a la fracción de dosis aplicada que llega al torrente sanguíneo; desde un punto de vista nutricional, la biodisponibilidad de un alimento indica la eficacia con la que los nutrientes son utilizados.

A continuación se indican dos definiciones de biodisponibilidad que pueden ser válidas para las consideraciones realizadas en esta Tesis Doctoral:

- Cantidad de nutriente disponible para absorberse en una forma fisiológicamente útil (Van Campen, 1999).
- La fracción de elemento que es solubilizado y finalmente absorbido a partir del tracto gastrointestinal y que llega a la circulación sistémica (Caussy, 2003).

1.1 FUNDAMENTOS FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DIGESTIVO HUMANO

La digestión es un proceso metabólico de transformación de alimentos ingeridos en sustancias químicamente más pequeñas y sencillas, fáciles de asimilar, para que el cuerpo pueda usarlas como fuente de energía, y para formar y alimentar las células. El tracto digestivo es el conjunto de órganos huecos que forman un largo y tortuoso tubo que va de la boca al ano. El aparato digestivo humano es el conjunto formado por el tracto digestivo junto con otros órganos que ayudan al cuerpo a transformar y absorber los alimentos, según se muestra en la Figura 1.

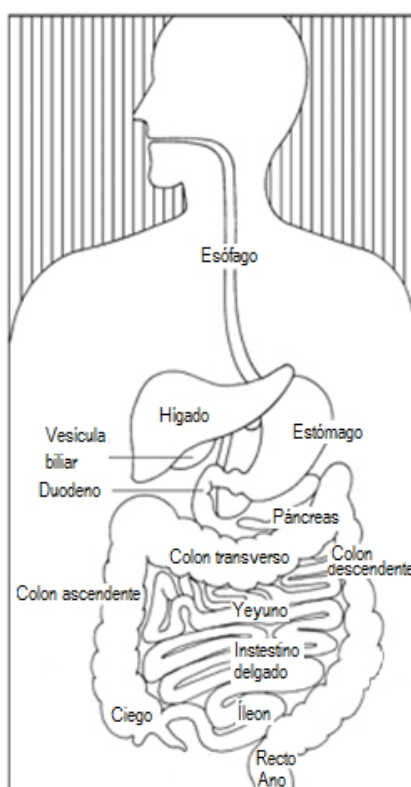


Figura 1 El aparato digestivo humano

En los siguientes apartados se describen de forma resumida los órganos que conforman el tracto digestivo agrupados según se indica en la siguiente relación:

- La boca y el esófago.
- El estómago.
- El duodeno.
- El intestino delgado.
- El intestino grueso.

Para la redacción de estos sub-apartados se ha usado como referencia las siguientes fuentes bibliográficas:

- Keshav, S. *The Gastrointestinal System at a Glance*. Primera edición.
- *Physiology of the Gastrointestinal Tract. Volume II*. Cuarta edición. Coordinado por L.R. Johnson.
- *Tratado de Fisiología Médica*. Décima edición. Coordinado y dirigido por A.C. Guyton y J.E.Hall.

1.1.1 LA BOCA Y EL ESÓFAGO

El proceso digestivo se inicia en la boca donde se llevan a cabo los procesos de masticación y deglución, y continúa en el esófago, cuya función primordial es conducir con rapidez los alimentos desde la faringe hasta el estómago.

La masticación es el proceso mediante el cual se tritura la comida recién ingerida y constituye el comienzo de la digestión. Es importante por varios motivos:

- La trituración de los alimentos evita la excoiación de la mucosa gastrointestinal y facilita el tránsito a través de las distintas partes del tubo digestivo.
- Rompe las membranas de celulosa indigeribles que rodean las porciones nutritivas de los alimentos crudos, permitiendo su aprovechamiento.
- Aumenta la superficie total de partículas alimenticias expuesta a secreciones digestivas.
- Permite mezclar los alimentos con la saliva.

La saliva se compone principalmente de agua (en torno a un 99%). Contiene gran cantidad de iones potasio y bicarbonato y dos tipos principales de secreción proteica: a) una enzima para digerir almidones, denominada ptialina, b) una secreción mucosa que contiene mucina, que cumple funciones de lubricación y protección de la superficie del resto del tubo digestivo. La secreción diaria normal de saliva oscila entre 800 y 1500 mL. Hay que indicar que la principal función de la saliva es lubricar el alimento y facilitar su posterior deglución. El bolo alimenticio va a ser atacado posteriormente por jugos gastrointestinales de acción más efectiva.

La deglución es un proceso complicado ya que la comida debe atravesar la faringe. Durante la mayor parte del tiempo la faringe ejecuta una función respiratoria, y solo durante una pequeña fracción de tiempo se transforma en conducto que propulsa los alimentos hacia el esófago, en donde se manifiestan movimientos peristálticos que son ayudados por la fuerza de la gravedad.

1.1.2 EL ESTÓMAGO

El estómago es un saco muscular que agita, digiere y almacena la comida. Su capacidad es de 2 L aproximadamente y sus funciones principales son:

- Reservorio para alimentos ingeridos.
- Mezclar alimentos con los jugos gástricos.
- Vaciar lentamente su contenido en el intestino delgado.

En menor medida, una cuarta función del estómago es digerir y absorber determinados principios inmediatos.

Las glándulas repartidas por las paredes interiores del estómago, además de ácido clorhídrico, generan pepsina, gastrina y otras enzimas que ayudan a regular el pH del tubo digestivo, así como la actividad de los diversos órganos que intervienen en el proceso digestivo. La secreción de estas glándulas responde a un control nervioso y a un control hormonal.

El pH en el interior del estómago vacío tiene un valor próximo a 2. Durante el proceso digestivo hay alimento dentro del estómago que eleva el pH. Cuando esto ocurre se segrega gastrina en el interior del estómago. La gastrina actúa sobre las células parietales u oxínicas de modo que secretan una solución ácida que contiene alrededor de 160 mmol/L de HCl. Cuando el pH desciende por debajo de 3 se suprime la secreción de gastrina, lo que a su vez provoca la inhibición de la secreción ácida.

El ritmo de contracciones en el estómago tiene un valor medio entre 3 y 5 por minuto. La mayor parte del tiempo las contracciones del estómago son rítmicas, orientadas a mezclar los alimentos. Para vaciar el estómago hacia el duodeno, se generan contracciones más intensas que se inician en la parte alta del estómago y cuando llegan a la parte baja suelen crear una presión de 30 a 60 mmHg, valor seis veces mayor que la presión de las ondas peristálticas de mezclas habituales.

Cada onda peristáltica empuja pequeñas cantidades de quimo al duodeno. Estas cantidades son de mL por lo general.

El origen de las ondas peristálticas que se producen en los músculos gastrointestinales está relacionado con acciones de polarización y despolarización de las fibras musculares. Estas variaciones de potencial eléctrico están a su vez determinadas por la presencia de iones de sodio y de potasio.

1.1.3 EL DUODENO

El duodeno es una porción de intestino delgado que mide 25 cm aproximadamente. Su importancia radica en que es el tramo donde el quimo entra en contacto con la secreción biliar y pancreática.

Como se ha comentado, el estómago aporta pequeñas cantidades de quimo al duodeno que pasan a través del píloro. El píloro es un esfínter que actúa de válvula de modo que solo deja pasar líquidos. Su constricción evita el paso de partículas que no se encuentren mezcladas con el quimo y hayan adquirido una consistencia casi líquida.

Los músculos lisos que conforman las paredes del duodeno experimentan un ritmo de aproximadamente 12 contracciones por minuto. Estas contracciones están influenciadas por las ondas del músculo gastrointestinal y además por la presencia de hormonas y enzimas segregadas en el estómago.

1.1.3.1 Páncreas

El páncreas es un órgano que vierte parte de su contenido en el duodeno. Los jugos pancreáticos contienen, además de enzimas, bicarbonatos e iones que neutralizan el ácido del estómago. La enzima más abundante es la tripsina, que hidroliza los hidratos de carbono y almidones. En el páncreas se secretan otras enzimas, tales como insulina, pero que no vierten al intestino sino que segregan al torrente sanguíneo, y por consiguiente no son consideradas en la simulación del tracto gastrointestinal.

La secreción de jugo pancreático alcanza un valor diario de 1,5 L aproximadamente.

1.1.3.2 Hígado

El hígado es un órgano que realiza varias funciones. Desde el punto de vista del tracto gastrointestinal tiene interés porque contiene la glándula biliar, que vierte su contenido en el duodeno. La glándula biliar produce entre 600 y 1000 mL/día de bilis, que a su vez está compuesta de bicarbonatos, ácidos biliares, colesterol, etc.

La bilis actúa sobre las grasas digeridas fragmentándolas.

1.1.4 EL INTESTINO DELGADO (YEYUNO E ÍLEON)

El intestino delgado es un órgano con forma tubular situado a continuación del duodeno y que mide más de 7 m. Aquí se produce la absorción de la mayor parte de los compuestos liberados durante el proceso digestivo.

Se denomina yeyuno a la porción de intestino delgado que hay a continuación del duodeno. El yeyuno mide 1/3 de la longitud total del intestino delgado y tiene un diámetro de 3 cm (valores aproximados). El tramo final del intestino delgado es el íleon; su longitud es 2/3 la longitud del intestino delgado y su diámetro es de 2 cm (también valores aproximados).

El ritmo de contracciones en los músculos del yeyuno y del íleon es algo inferior al del duodeno, entre 8 y 9 por minuto. La velocidad de impulsión del quimo está

comprendida entre 0,5 y 2 cm/s, siendo mayor en los primeros tramos (parte *proximal*) y menor en los tramos próximos al intestino grueso (parte *distal*).

En el intestino delgado se segrega un moco alcalino cuya función principal es proteger las paredes intestinales, que están recubiertas de pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades (más abundantes sobre todo en el yeyuno).

1.1.5 EL INTESTINO GRUESO

El intestino grueso es un órgano con estructura tubular, de aproximadamente 1,5 m de largo, que conforma la última estructura que procesa los alimentos durante la digestión. Recibe las sustancias indigestibles del intestino delgado.

La presencia de abundantes bacterias que conforman la flora intestinal contribuye a fermentar los residuos que no han podido digerirse, obteniendo de ello sustancias aprovechables.

El intestino grueso, también denominado colon, tiene un diámetro de 8 cm aproximadamente, y sus funciones principales son:

- Absorción de agua y electrolitos procedentes del quimo.
- Almacenamiento de la materia fecal hasta el momento de su expulsión.

Las paredes musculares del intestino grueso carecen de los pliegues y vellosidades del intestino y los movimientos, siendo similares, son más lentos. Las ondas musculares propias del músculo gastrointestinal se combinan en el intestino grueso con movimientos de mezcla, también denominados haustraciones. Se trata de una combinación de contracciones tanto longitudinales como transversales que tiene como consecuencia remover toda la materia fecal, de modo que quede gradualmente expuesta a la superficie de las paredes interiores del intestino, permitiendo la absorción progresiva de líquido y sustancias disueltas.

La secreción principal del intestino grueso es un moco que contiene cantidades moderadas de iones bicarbonato y cuyas funciones son proteger las paredes intestinales frente a las excoiaciones y actividad bacteriana, así como proporcionar un medio adherente que mantiene unida la materia fecal.

1.2 SIMULACIÓN DE LAS DISTINTAS PARTES QUE CONFORMAN EL SISTEMA DIGESTIVO

A continuación se comentan las técnicas y métodos más habituales que se emplean para simular los órganos que conforman el sistema digestivo humano y cuya fisiología se acaba de resumir.

Como regla general, para simular los fluidos corporales tendrán preferencia aquellos que tienen una mayor incidencia en la descomposición de la materia. En la descripción fisiológica del sistema digestivo realizada anteriormente se ha esbozado la presencia de enzimas que sirven para regular el funcionamiento de diversas partes del organismo. La acción de estas enzimas es simulada mediante los algoritmos de control que incorporan las aplicaciones informáticas.

1.2.1 SIMULACIÓN DE LA BOCA

La forma más simple de simular la masticación es la trituración mecánica de los alimentos. Para ello se puede emplear picadoras convencionales de uso común o recurrir a masticadores específicos (Hoebler, 2000). También es posible encontrar en el mercado equipos homogeneizadores de comida, tales como la gama *Stomacher* ofertada por Seward Ltd. Si los alimentos se encuentran en estado líquido es común omitir la simulación de la boca y comenzar directamente por la simulación gástrica (de Boever, 2001; Mainville, 2005).

Para simular la mezcla de los alimentos con saliva se recurre a diversos métodos en los que se puede utilizar saliva natural o saliva artificial.

En la literatura científica hay descritos métodos que permiten producir saliva artificial (Humphrey, 2011; Alameida, 2008) aunque también se puede conseguir diversas formulaciones ya preparadas que son ofertadas por los laboratorios farmacéuticos especializados. Por otro lado, hay autores que prefieren recurrir directamente a la saliva natural humana. Jie-Lun Hu (Hu, 2013) describe el proceso de preparación de saliva mediante enjuagues de 30 segundos que se repiten en intervalos de entre 2 y 2,5 minutos. El número de enjuagues depende del volumen de saliva deseado.

1.2.2 SIMULACIÓN DEL ESTÓMAGO

La forma más común de simular el estómago es usar un reactor en el que se mezcla la comida con los fluidos gástricos simulados. Cuando la comida se encuentra en estado líquido el estómago se puede simular con un reactor tipo tanque agitado. El uso de bombas peristálticas o dispositivos similares permite simular las secreciones gástricas.

El conjunto de tanque agitado y dispositivos de dosificación permite simular las funcionalidades que resultan de mayor interés: motilidad gástrica, regulación de pH y otras secreciones. No se suele simular la absorción gástrica.

Regulación de pH.

El estómago se comporta como un sistema distribuido compuesto de multitud de glándulas que generan una cierta cantidad de ácido clorhídrico, dependiendo de ciertos factores. En condiciones normales, cuando la acidez del estómago se aproxima a valores de pH 3 se activan una serie de procesos que inhiben de forma progresiva la segregación del ácido. De forma global el comportamiento se asemeja a un tanque o recipiente al que se añade una cierta cantidad de HCl por unidad de tiempo hasta que el pH alcanza un nivel determinado. Este proceso se simula mediante un mecanismo que bombea ácido, regulado por un sistema de control que usa como parámetros de entrada la lectura de uno o varios sensores de pH (Mainville, 2005; Sumeri, 2008).

Motilidad gástrica.

El movimiento rotatorio de una turbina en un tanque agitado simula el movimiento de los alimentos debido a las contracciones de las paredes musculares del estómago. Estas contracciones son lentas y tienen por objeto garantizar una buena mezcla de alimentos y jugos gástricos. Es por ello que la velocidad de rotación de la turbina empleada se ajustará de modo empírico para garantizar una mezcla homogénea del contenido del reactor.

Otros fluidos gástricos.

En determinados tipos de ensayos se usan otros compuestos adicionales para completar la simulación de los fluidos gástricos, tales como pepsinas y en menor medida lipasas gástricas. Es infrecuente el uso de lipasas gástricas en la fase de simulación gástrica, al ser su concentración muy pequeña y presentar una mayor efectividad el empleo de lipasas pancreáticas durante la fase de simulación duodenal. Sin embargo, en trabajos realizados por algunos autores (Singh, 2009; McClements, 2009), ha resultado de utilidad estudiar la actividad de la lipasa gástrica durante la simulación del tracto gastrointestinal de individuos que sufren insuficiencia pancreática. Por otro lado, la hidrólisis de las proteínas en el estómago se debe a la acción del ácido y de las pepsinas, siendo estas las responsables de la ruptura de péptidos y proteínas en cadenas más pequeñas de aminoácidos; por lo tanto procede su uso en ensayos en los que se simula cómo son digeridos determinados productos alimenticios en concreto.

1.2.3 SIMULACIÓN DEL DUODENO

Para la simulación del duodeno se suele utilizar un segundo biorreactor en el que se mezcla el contenido procedente del reactor que simula el estómago con los fluidos intestinales simulados (Mainville, 2005). Otra opción es usar el mismo reactor (Sumeri, 2008) empleado para simular el estómago y verter en él los fluidos que simulan los jugos pancreáticos y los jugos biliares. De este modo un único reactor simula en una primera fase el estómago y en una segunda fase simula las condiciones químicas del duodeno.

Los jugos pancreáticos son simulados por una base que neutraliza los jugos gástricos. Dependiendo del objeto de la simulación puede interesar que los jugos pancreáticos simulados contengan otras enzimas, como la lipasa pancreática y la pancreatina (Kalantzi, 2006). Estas enzimas se encuentran disponibles en el catálogo de Sigma-Aldrich.

Como base se suele emplear NaHCO_3 (Sumeri, 2008) o NaOH (Mainville, 2005). Para simular la bilis se recurre por lo general a compuestos comerciales que se ofertan como sales biliares.

La cantidad de reactivos adicionados así como su caudal se ajustan para guardar proporcionalidad entre el volumen contenido en el reactor y el tamaño del duodeno humano (Lindahl, 1997).

1.2.4 SIMULACIÓN DEL INTESTINO DELGADO

Es común diferenciar tanto en tratados de fisiología como en procesos de simulación el duodeno del resto del intestino delgado. Influye en esta decisión el hecho de que realizan funciones distintas. El duodeno se caracteriza por ser el lugar donde se mezcla el quimo con los jugos pancreáticos y biliares, lo que conlleva la neutralización del ácido gástrico. En el yeyuno e íleon en cambio predomina el proceso de absorción. Del mismo modo, existen métodos de simulación *in vitro* que diferencian la simulación del yeyuno de la simulación del íleon (Minekus, 1995) mientras que otros métodos utilizan un solo reactor para simular todo el intestino delgado (Mainville, 2005; Sumeri, 2008). El uso de un reactor tipo tanque agitado permite controlar variables físicas (temperatura, motilidad) y químicas (nivel de pH), aunque la principal función que se realiza en el intestino delgado es la absorción de nutrientes. En este sentido, existen estudios relacionados con diversas técnicas que permiten simular y/o modelar la absorción de principios activos de manera rápida y fiable (Conrad, 1963; Amidon, 1995; Abraham, 2002; Herrera, 2012). A continuación se indican los métodos más comunes usados para imitar las propiedades más relevantes de la mucosa intestinal y que se han considerado de mayor interés en el contexto de esta introducción:

- Métodos basados en solubilidad.

- Métodos que emplean líneas celulares.
- Métodos con membranas artificiales.

Los métodos basados en solubilidad se utilizan principalmente en modelos estáticos de simulación, y consisten en medir la cantidad de componente soluble en el sobrenadante obtenido por centrifugación tras la digestión gastrointestinal (Crews, 1983).

Los métodos que emplean líneas celulares simulan el proceso de digestión humano en combinación con cultivos celulares que simulan los procesos de captación y transporte en el epitelio intestinal (Artursson, 1997).

Los métodos con membranas artificiales incorporan una membrana de filtración en la fase de digestión intestinal para simular la difusión a través del epitelio intestinal. El proceso de filtración puede llevarse en equilibrio (Miller, 1981) o en continuo (Abraham, 2002). Las principales ventajas de utilizar membranas artificiales son su reproducibilidad, su bajo costo y la rapidez con la que se realizan estudios de relaciones existentes entre la estructura química de fármacos (Herrea-Ruiz, 2012). Entre sus principales desventajas están la ausencia de enzimas y que en la mayoría de modelos no están conformadas como bicapas lipídicas.

1.2.5 SIMULACIÓN DEL INTESTINO GRUESO

Los modelos aplicados para simular la digestión suelen incluir métodos de simulación gástrica y de diversas fases de la simulación del intestino delgado. Con menos frecuencia se incluye la simulación del intestino grueso. En cualquier caso, la simulación del intestino grueso es muy similar a la simulación del intestino delgado (Molly, 1993; Minekus, 1995). Los cultivos celulares que simulan el epitelio y son usados en la simulación del intestino delgado son substituidos por otros tipos de cultivos que simulan la acción de la flora bacteriana, simulando de este modo las distintas etapas del intestino grueso.

En general, los métodos *in-vitro* proporcionan estimaciones relativas, no absolutas, sobre biodisponibilidad, puesto que es complejo tener en cuenta todos los factores fisiológicos intrínsecos del organismo. A pesar de esta limitación se llevan a cabo pues proporcionan datos útiles que pueden ser usados para establecer comparaciones y evaluar los efectos causados por diferentes factores durante la ingesta de alimentos y fármacos.

2.-OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han marcado los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Desarrollo y puesta en funcionamiento de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal. Para ello se dispondrá de un biorreactor de membrana que incorpora en serie:

- Reactor tipo tanque agitado.
- Módulo tubular con membrana de filtración.

Objetivo 2: Control y supervisión por un sistema informático de los procesos y reacciones que se llevan a cabo en dicho biorreactor, con el objeto de automatizar su uso y disponer de opciones de configuración y de registro de datos.

Objetivo 3: Desarrollo de un conjunto de programas informáticos que permitan a un usuario el manejo del sistema. Dichos programas dispondrán de interfaces gráficas de usuario fáciles de usar y entender, e incorporarán utilidades que permitan calibrar los elementos que lo precisen, así como herramientas de prueba y diagnóstico.

Objetivo 4: Realización de un conjunto de ensayos y proponer aplicaciones que otorguen validez al sistema. Si bien es posible un uso más amplio del simulador, está previsto enfocar la funcionalidad del mismo para ensayos destinados a evaluar la eficacia de vehículos transportadores de fármacos y estudios de biodisponibilidad de principios activos.

3.- ANTECEDENTES

3 ANTECEDENTES

En este capítulo se resumen las particularidades más relevantes de varios modelos de simulación del tracto gastrointestinal. Los modelos SHIME y TIM son los más referenciados en la literatura científica relacionada con la simulación *in vitro* de procesos digestivos. Se exponen otros tres modelos de sistemas que han sido tomados como referencia para desarrollar el prototipo simulador del tracto gastrointestinal objeto de esta Tesis Doctoral. Estos tres modelos son el *modelo dinámico para el estudio de probióticos* presentado por Isabel Mainville, el *digestor dinámico in vitro* patentado por AINIA y el *simulador simple del tracto gastrointestinal* descrito por Ingrid Sumeri.

3.1 SIMULADOR DEL ECOSISTEMA MICROBIANO INTESTINAL HUMANO (SHIME)

El término SHIME es el acrónimo de *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*, cuya traducción al castellano se corresponden con *simulador del ecosistema microbiano intestinal humano*. Este simulador fue desarrollado en el año 1993 en Bélgica (Molly, 1993). Se trata del primer simulador *in vitro* multietapa que apareció en la literatura científica. Inicialmente se componía de cinco reactores multicámara controlados por ordenador que simulaban las condiciones del duodeno/yeyuno, íleon, intestino ciego/colon ascendente, colon transversal y colon descendente donde se estudiaban las interacciones de la población microbiana en el colon. Posteriormente Patrick de Boever (de Boever, 2001) añadió un sexto reactor (Figura 2) con objeto de simular el tránsito estomacal.

En comparación con resultados obtenidos *in vivo*, el SHIME es capaz de proporcionar resultados reproducibles y permite controlar varios parámetros para realizar estudios mecánicos (Van de Wiele, 2004). Se trata de un modelo

validado y barato en comparación con modelos de experimentación *in vivo* y sin las consideraciones éticas que acarrearán los ensayos con animales.

Este modelo además permite el tratamiento de grandes cantidades de muestra.

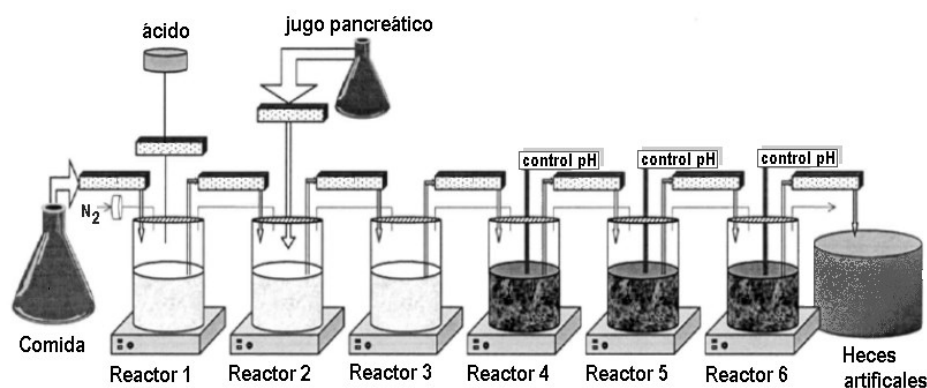


Figura 2 Diagrama del modelo SHIME

Los primeros dos reactores están basados en el principio de carga-descarga para simular la ingesta y la digestión de alimentos en el estómago y duodeno/yeyuno. En el primer reactor se bombean 200 mL de medio a pH 2,0 cada 8 horas y se agita a 150 rpm mediante un agitador magnético. Tiene un tiempo de residencia de 2 a 3 h.

En el segundo reactor se simula la segregación de jugo pancreático suplementado con bilis a una velocidad de 100 mL/h durante una hora, con objeto de neutralizar la acidez estomacal (Alander, 1999). La bilis se compone de $NaHCO_3$, pancreatina y *oxgall*. Este último es un compuesto comercial que consiste en bilis deshidratada para uso en cultivos microbiológicos. Este segundo reactor tiene un tiempo de residencia de 4 horas.

El reactor íleon posee un tiempo de residencia de 4 horas y pH entre 6,5 y 7,0.

Los últimos tres reactores están diseñados para simular la microbiota del colon. Estos reactores son inoculados con 50 mL de una suspensión fecal al 20% preparada en tampón fosfato sódico anaerobio (0,1 M, pH 7,0) y agitado de forma continua a 150 rpm mediante agitadores magnéticos (Possemiers, 2004). En el reactor correspondiente al intestino ciego y colon ascendente se procesan 1000 mL de mezcla reaccionante durante un tiempo de residencia de 20 horas a pH entre 5,5-6,0. En el reactor correspondiente al colon transversal, se alimentan 1600 mL de mezcla durante un tiempo de residencia de 32 horas con un rango de pH entre 6,0 y 6,4, mientras que el reactor que simula el colon descendente, 1200 mL durante 24 horas a pH 6,4-6,8 (Alander, 1999).

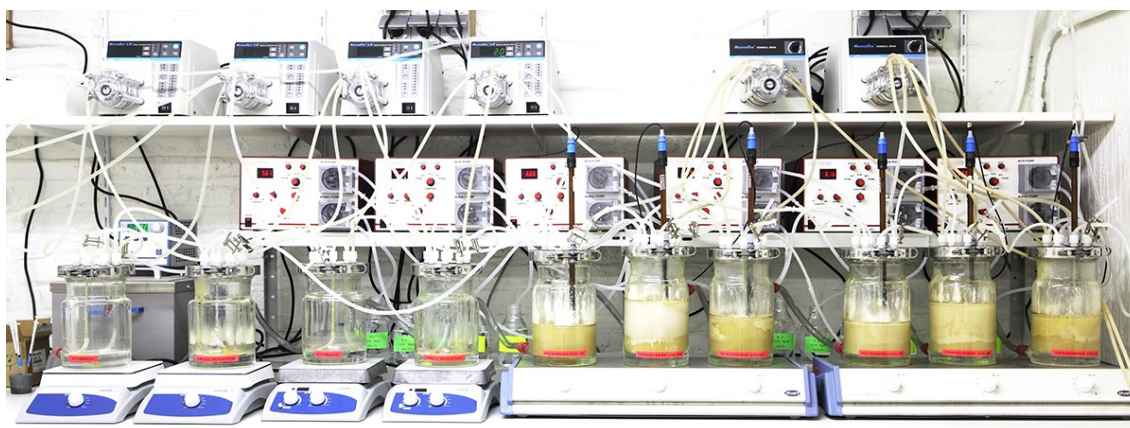


Figura 3 Fotografía SHIME

Todos los reactores se mantienen en condiciones anaeróbicas mediante la inyección de N_2 en el espacio de cabeza dos veces al día durante 15 minutos. El pH del sistema se controla mediante soluciones de HCl y/o NaOH 0,1 M y la temperatura es regulada a 37 °C mediante un termostato (Molly, 1993).

En la Figura 3 se observa una imagen real del modelo SHIME. Este modelo puede utilizarse para diferentes tipos de estudios nutricionales, farmacéuticos, de seguridad alimentaria y micro-ecológicos. Permite conocer la fracción biodisponible de nuevos compuestos, la eficacia y el comportamiento de nutraceuticos, la presencia de alimentos modificados genéticamente (GMO), probióticos, prebióticos y contaminantes medioambientales en la microbiota del tracto gastrointestinal a través del análisis de la actividad de la fermentación, de la composición de la flora microbiana en el colon, de las actividades enzimáticas, gases producidos, etc. (Kontula, 1998). Sin embargo, SHIME es un modelo algo simplificado debido a que omite los mecanismos de absorción de metabolitos y fluidos. Asimismo, omite la adhesión de microorganismos a las paredes del reactor y tubos de conexión así como la presencia de fluidos salivares, lo que resulta en una variación en la supervivencia de la microbiota ensayada (Mattila-Sandholm, 1999). Por otro lado, la capacidad tamponante de los alimentos y/o cápsulas debe de ser también considerada a la hora de estudiar las cepas probióticas que sobreviven las condiciones ácidas existentes en el dispositivo SHIME. Otros autores (de Wiele, 2004) exponen que el sistema SHIME es inoculado con bacterias fecales humanas que no son representativas de la composición de la microbiota existente en las diferentes partes del colon

3.2 MODELO GASTROINTESTINAL TIM

El modelo gastrointestinal TIM es un sistema de simulación *in vitro* del tracto gastrointestinal ampliamente divulgado y reconocido que fue creado por Mannes Minekus y Robert Havenaar (Minekus, 1995) para la *Organización holandesa para la investigación científica* (“Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek”) también denominada TNO.

Este sistema consta de varios reactores controlados por ordenador que simulan las condiciones existentes en diferentes órganos del sistema digestivo. Se denomina de forma genérica TIM-1 al modelo que consta de 4 reactores que simulan el estómago, duodeno, yeyuno e íleon respectivamente. Se denomina TIM-2 al modelo que consta de un reactor con el que se simula el intestino grueso.

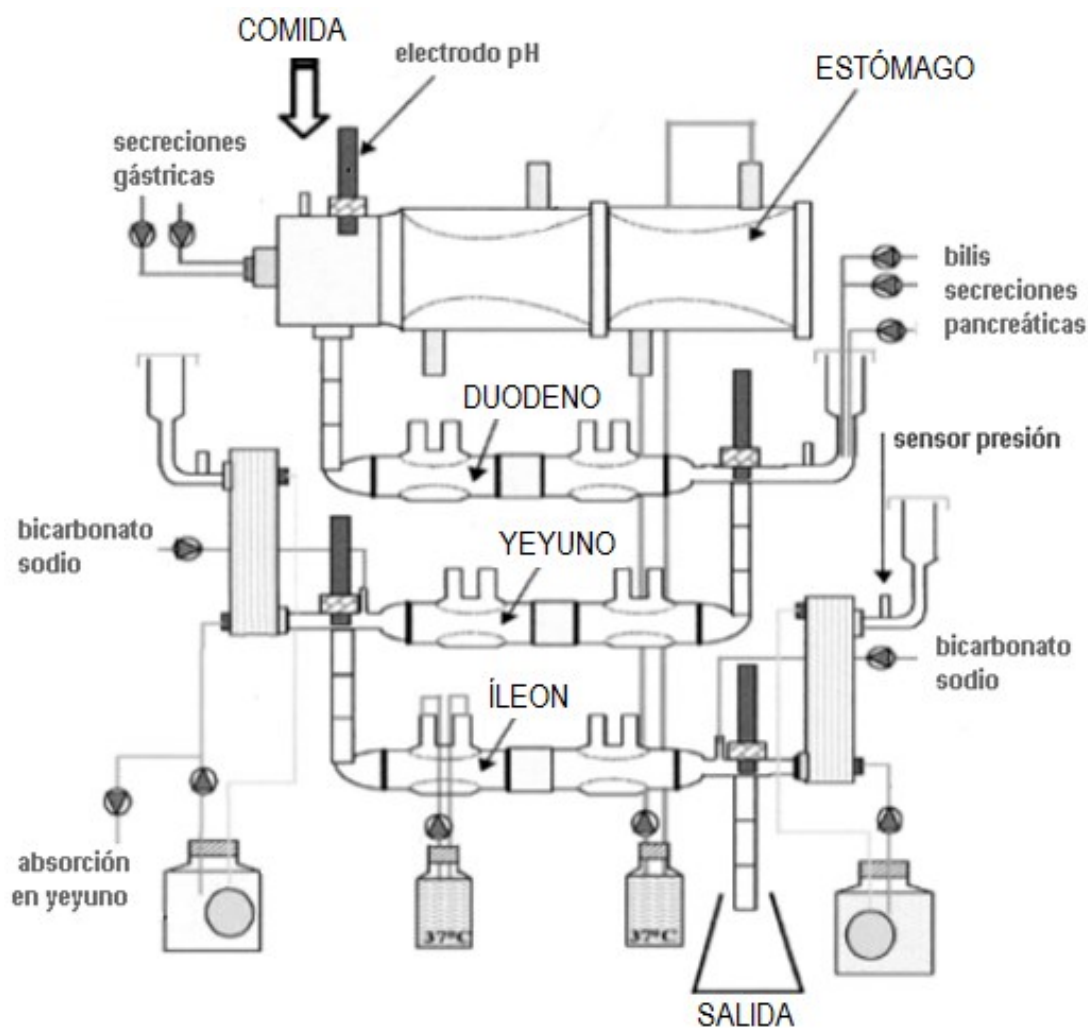


Figura 4 Diagrama del sistema TIM-1

El diagrama mostrado en la Figura 4 muestra un esquema de implementación del modelo TIM-1 y el diagrama mostrado en la Figura 5 se corresponde con el modelo TIM-2.

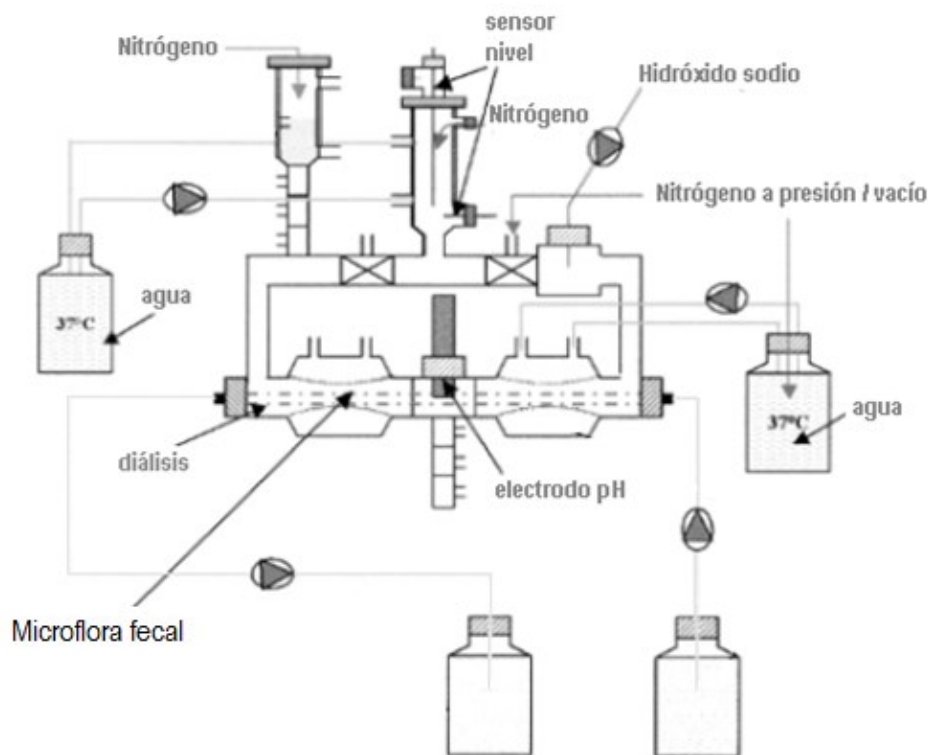


Figura 5 Diagrama del sistema TIM-2

El sistema TIM es un modelo validado y, al igual que el resto de simuladores *in vitro*, permite realizar simulaciones a un coste inferior que los equivalentes ensayos *in vivo*, y sin las consideraciones éticas que acarrearán los experimentos con animales. Los datos se pueden obtener a partir de pequeñas cantidades de productos y controles, consiguiendo reproducibilidad y precisión aceptable.

Algunas de las características del modelo TIM son la inclusión de la simulación de los movimientos peristálticos, la presión controlada, la absorción de nutrientes y agua en la cámara correspondiente al intestino delgado y la simulación de la velocidad de vaciado gástrico y tiempo de tránsito intestinal, además de simular la temperatura corporal. Asimismo, se inyectan secreciones gástricas, biliares y pancreáticas para controlar el pH (Blanquet, 2004).

Cada compartimiento de los sistemas TIM-1 y TIM-2 se compone de reactores de vidrio con camisa interior formada por paredes flexibles donde se bombea agua. El agua se mantiene a 37 °C con el objeto de conseguir temperatura constante en el interior de cada reactor similar a la del cuerpo humano. Los movimientos peristálticos se simulan mediante cambios en la presión de

inyección de agua en la camisa. El contenido de los reactores se mantiene siempre bajo condiciones anaeróbicas mediante la introducción de N_2 .

En el caso del TIM-1, el tránsito del quimo se regula mediante válvulas peristálticas que conectan un compartimiento con el adyacente. El pH es controlado por ordenador de acuerdo con curvas predefinidas de valores 4,5, 4,2, 2,1 y 1,7 durante 5, 20, 60 y 90 minutos respectivamente en el compartimiento correspondiente al estómago. En la sección intestino delgado se mantienen valores de pH de 6,5, 6,8 y 7,2, para simular duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente. El agua y los productos digeridos son eliminados de los reactores que simulan el yeyuno e íleon mediante bombeo a 10 mL/min a través de membranas de fibra hueca (Blanquet, 2003). En el caso del sistema TIM-2, las muestras fecales deben ser inoculadas 48 horas antes de su utilización para permitir a la microflora su estabilización previa a la introducción de la bacteria u organismo en estudio. El aporte de alimentación se fija en 4 mL/h y la eliminación de quimo a 2 mL/h, lo que proporciona un tiempo medio de renovación del contenido en el intestino grueso de 36 horas, lo que está de acuerdo con el tiempo fisiológico de tránsito en el cuerpo humano. El pH del compartimiento que simula el intestino grueso se mantiene a 5,8 y es controlado con la adición de una disolución NaOH 5M. Los productos de la fermentación y el agua son retirados por bombeo a 2 mL/min a través de membranas de fibra hueca (peso molecular de corte 50 kDa) (Minekus, 1995; Blanquet, 2003).



Figura 6 Fotografía de TIM-1

El sistema TIM puede ser utilizado para llevar a cabo varios estudios nutricionales, entre otras aplicaciones. Es posible monitorizar la digestión del alimento, la biodisponibilidad de los nutrientes absorbidos y las interacciones de alimentos entre factores estimulantes e inhibidores.

Sin embargo, los reactores empleados en el sistema TIM no reproducen la mecánica de fluidos y las fuerzas cortantes presentes en las paredes del tracto gastrointestinal humano, como ocurre en los reactores agitados. Por otro lado, el proceso de absorción simulado mediante bombeo a través de membranas de fibra hueca no se parece al verdadero proceso natural de absorción *in vivo*.

Otra desventaja de la utilización de TIM-2, donde la materia fecal debe ser inoculada para realizar estudios en el intestino grueso, es que la interacción de la flora bacteriana y el huésped no pueden ser estudiadas.

3.3 MODELO DINÁMICO PARA EL ESTUDIO DE PROBIÓTICOS

Este modelo fue presentado en el año 2005 por Isabel Mainville (Mainville, 2005) y desarrollado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Agricultura y Agroalimentación de Canadá.

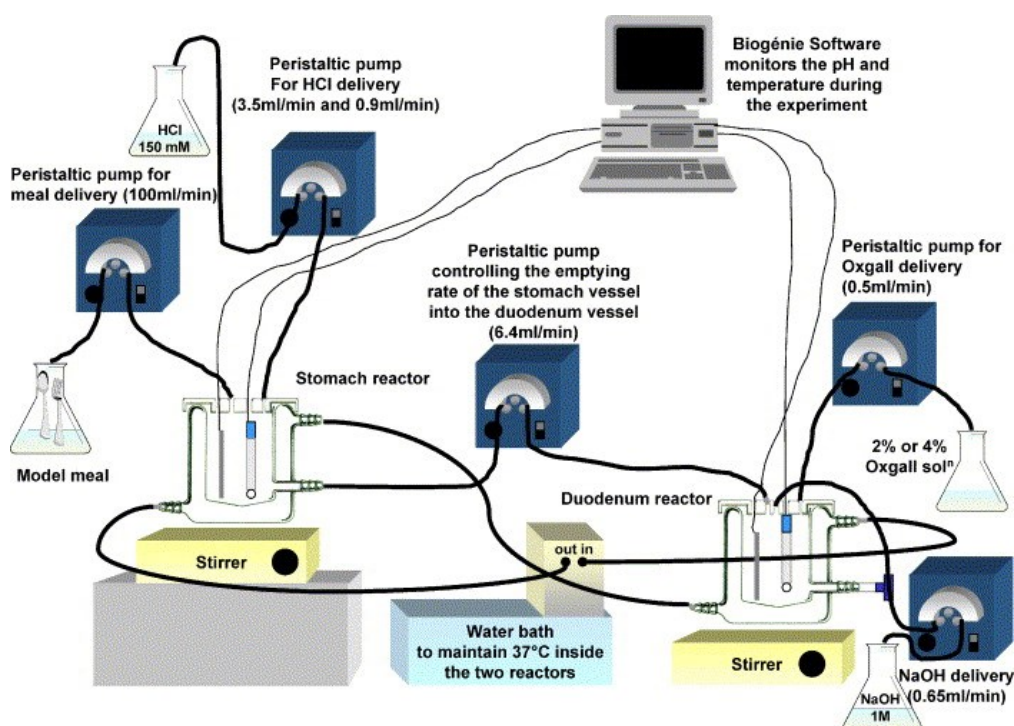


Figura 7 Modelo dinámico del tracto gastrointestinal superior

Se trata de un modelo dinámico del tracto gastrointestinal superior de los seres humanos que consta de dos reactores que simulan las condiciones del estómago y del duodeno, respectivamente. Ambos reactores se mantienen a 37 °C para simular la temperatura del cuerpo humano. El modelo también incluye una matriz de alimento.

La Figura 7 muestra un esquema del modelo dinámico en el que se observan dos vasos de precipitados de 1 L de vidrio encamisado que representan el estómago y el duodeno, respectivamente. Ambos vasos incorporan electrodos para medir pH y sondas de temperatura y se soportan sobre un agitador magnético. La temperatura dentro de los reactores es controlada mediante recirculación de agua a 37°C por las camisas de los vasos. El uso de bombas peristálticas permite controlar la adición de reactivos, así como la velocidad de vaciado del reactor que simula el estómago en el reactor que simula al duodeno.

En comparación con otros modelos estáticos, este modelo dinámico simula los acontecimientos de la ingesta de alimentos y digestión de los mismos. El uso de una matriz con comida como parte del modelo hace que éste sea más realista y también más flexible. El control de pH y concentración de HCl y bilis se asemejan a valores *in vivo* permitiendo simular variaciones de pH del estómago antes, durante y después de las comidas y la presencia de bilis en el intestino delgado (Mainville, 2005).

Sin embargo el diseño actual, que está pensado para el estudio de probióticos, no permite el ensayo de adhesión de las bacterias a las células epiteliales o moco, no contiene bacterias residentes y no tiene mecanismos de retro-alimentación de la simulación intestinal.

3.4 DIGESTOR DINÁMICO IN VITRO

El Centro de Investigación y Desarrollo tecnológico del sector agroalimentario, Ainia, desarrolló en el año 2009 un digestor artificial que simula el proceso de digestión humano. La descripción de este modelo está recogida en la patente ES2361983 bajo el nombre de *Equipo modular de digestión in vitro*, y en la página web de la entidad, donde se denomina *Digestor dinámico in vitro*. (https://www.ainia.es/html/sites/09/noticias/Presentacion_virtual_digestor.swf). Este sistema (Figura 8) permite observar de forma monitorizada y estudiar cómo se comportan los componentes de un alimento en el proceso de digestión.

El prototipo, además de evaluar la cantidad de compuestos seleccionados para un alimento que absorbe el organismo, identifica de forma precisa las interacciones entre nutrientes. Permite estudiar nuevas formulaciones que

posibiliten una mejor absorción de los nutrientes, a la vez que analizar si estos se pierden en el proceso digestivo o se digieren por el organismo para determinar cómo proteger al compuesto para que llegue a la fase final de la digestión



Figura 8 Digestor dinámico in vitro desarrollado por Ainia

Este digestor *in vitro* simula tanto el proceso de digestión gástrica como el de digestión intestinal y se compone de varios módulos o compartimentos de vidrio interconectados. Cada módulo contiene en su interior membranas flexibles abiertas por sus extremos que generan un espacio intermedio entre la pared del módulo y la propia membrana.

En la simulación gástrica el bolo alimenticio se transforma en quimo a través de la acción mecánica y secreción gástrica. La acción mecánica se simula mediante puntos de entrada y salida de agua que posibilitan la compresión del bolo alimenticio simulando movimientos peristálticos.

Para simular la digestión intestinal, el modelo distingue la etapa de simulación del duodeno de la etapa en la que se simula la absorción intestinal

Durante la simulación del duodeno se desarrollan nuevos movimientos peristálticos y se introducen secreciones intestinales.

El sistema incorpora un módulo de absorción de nutrientes que cuenta con una membrana filtro que impide el paso de partículas de tamaño mayor de 10 kDa. Tras este paso, la disolución final está lista para su análisis en laboratorio.

En 2008 Ingrid Sumeri y otros presentaron un simulador del tracto gastrointestinal basado en un único biorreactor (Sumeri, 2008), con el objeto de disponer de un modelo *in vitro* para evaluar el potencial probiótico de los alimentos.

Este simulador consta de un fermentador equipado de sondas de pH, temperatura y pO₂, además de balanzas y bombas de caudal fijo y variable. Las bombas se usan para controlar el flujo de HCl, NaHCO₃, ácidos biliares, y medio de cultivo. El biorreactor se mantiene a temperatura de 37 ± 0,1 °C y en condiciones anaeróbicas mediante purgas con nitrógeno.

Para simular las condiciones gástricas durante el tránsito gastrointestinal, inicialmente se adiciona 100 mL de disolución HCl 0,01 M con objeto de imitar el estómago vacío, lo que da lugar a un pH cercano a 2. A continuación, se introduce la muestra de comida (instante P1) seguida de una valoración del contenido del reactor hasta un pH igual a 3 con HCl 1 M a una velocidad de 20 mmol/h ((instante P2).

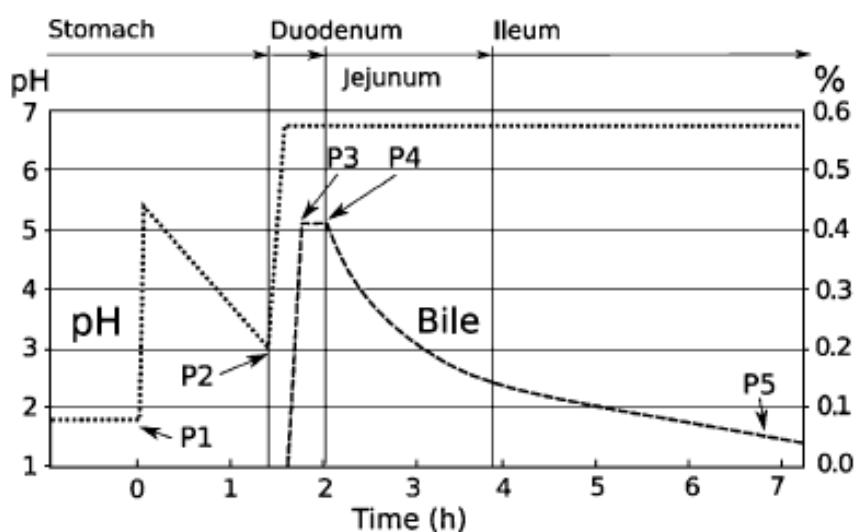


Figura 9 Evolución de variables en un simulador del tracto gastrointestinal

Para simular el paso del alimento desde el estómago hasta el duodeno se neutraliza el contenido del reactor hasta pH 6 mediante la adición de NaHCO_3 1M a una velocidad de 4,5 ml/min. Dependiendo de la capacidad tamponante de la muestra ensayada el paso de neutralización puede durar entre 3 y 10 minutos. En ese momento se ajusta la concentración de sales biliares en el reactor

mediante la adición de una solución de sales biliares a la velocidad de 4 ml/min durante un periodo de tiempo de 10 minutos (instante P3).

Finalmente, el contenido del reactor es diluido con medio de dilución para simular la absorción de sales biliares y componentes de la alimentación en el yeyuno e íleon (instante P4).

Durante la fase de dilución, el pH del reactor se mantiene a pH 6,5 mediante valoración con NaHCO_3 , mientras que el volumen se mantiene constante controlando el peso total del reactor. La velocidad de dilución ha sido seleccionada para que tras 7 horas, que corresponde a tiempo en el que el alimento alcanza el intestino grueso, la concentración de sales se diluya 10 veces.

La Figura 9 muestra la evolución en el tiempo de las variables controladas en el simulador del tracto gastrointestinal. P1, P2, P3, P4 y P5 muestran los puntos clave de muestreo correspondientes a la muestra antes de la inyección, entrada al duodeno, inmediatamente tras la adición de bilis, entrada al yeyuno, y finalmente en el íleon, respectivamente.

Este modelo ha sido usado por más investigadores (Ritter, 2009; Vamanu, 2012) que lo han encontrado menos complejo que los modelos multicámara y con menos parámetros que controlar. También se ha usado un biorreactor de tanque único para la simulación *in vitro* de procesos digestivos, incluyendo los procesos de fermentación debidos a la microflora intestinal en el colon (Fuentealba, 2014).

El modelo simulador del tracto gastrointestinal compuesto por una sola cámara ha sido validado para determinados estudios de supervivencia de probióticos. Sin embargo ha sido cuestionado (Tompkins, 2011) al ser insuficiente para el estudio de determinados probióticos adhesivos que se reparten selectivamente en la mucosa intestinal.

4.- EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

4 EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS

En este capítulo se exponen los recursos utilizados para la realización del prototipo simulador del tracto gastrointestinal y las principales materias primas que se van a usar en los ensayos.

El capítulo se divide en dos partes. En la primera parte, denominada *Equipamiento*, se describe el equipamiento usado para el desarrollo del prototipo simulador y la realización de medidas. En la segunda parte, denominada *Reactivos*, se relacionan los reactivos empleados para emular los fluidos gástricos y para elaborar compuestos que van a ser objeto de estudio durante los ensayos de simulación del tracto gastrointestinal.

Posteriormente, en el capítulo de *Resultados* se describirá el uso dado a estos recursos, las modificaciones realizadas y los subsistemas desarrollados para complementarlos. También se describirán en el posterior capítulo de resultados los procedimientos y las técnicas empleados para elaborar los compuestos que son objeto de estudio.

4.1 EQUIPAMIENTO

Los siguientes apartados describen un conjunto de equipos, elementos y software disponible que han facilitado el desarrollo del prototipo simulador del tracto gastrointestinal y el análisis *in situ* de resultados obtenidos durante los ensayos de simulación. En el sub-apartado de *Equipos complementarios* se relacionan también otros equipos a los que se hace referencia en esta Tesis Doctoral pero que son usados por los técnicos asignados a tal fin, como es el caso de instrumentos de análisis de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación.

4.1.1 REACTOR TIPO TANQUE AGITADO

El Grupo de Investigación *TEP-025*, Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos dispone en sus instalaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada de un fermentador *Braun Biostat B* (Figura 10) comercializado por la corporación Braun Biotech International, y que en adelante se designará con el término abreviado de *Biostat*.



Figura 10 Fotografía del reactor tanque agitado *Biostat B*

El sistema se compone de una unidad de control y un vaso reactor dotado de sistema de agitación mediante turbinas, controles de temperatura, pH, oxígeno disuelto, espuma y nivel; todos ellos, dotados de sus correspondientes sensores. Incluye tomas de muestras y entradas para adición de reactivos.

4.1.1.1 Características principales: descripción general

El manual de operaciones que acompaña al equipo describe las diversas partes o subsistemas que lo componen, así como su funcionalidad y modo de operación. A continuación se resume las características consideradas más significativas. Durante la descripción de algunos subsistemas se hace referencia al modo de regulación *PID*. Este concepto se aclara con más detalle en el Anexo III de esta Memoria.

SISTEMA TERMOSTATO

Está formado por un sistema cerrado de circulación con una bomba y una línea de conexión a la camisa, un calentador eléctrico y un circuito de agua fría. La medida de temperatura se realiza usando un sensor tipo *Pt-100* inmerso en el interior del tanque, en contacto físico con el contenido del reactor. Incluye una resistencia eléctrica de 600 W para calentar el circuito y una válvula solenoide que regula la inyección del agua de refrigeración.

La temperatura se fija en el panel de control o mediante comandos por el puerto serie. La medida digital y el sistema de control, basado en un lazo de regulación *PID*, aseguran un control de temperatura preciso y constante.

CONTROL DE AGITACIÓN

El tanque agitado está provisto de un eje con dos turbinas de disco tipo *Rushton*, compuestas por cuatro paletas, accionado por un motor de 180 W que aplica potencia al agitador mediante un acoplo elástico. La velocidad de agitación se puede ajustar desde el panel de control o mediante comando enviado por el puerto serio. El margen de velocidad está comprendido entre 50 y 1200 rpm y el sistema está diseñado para garantizar una velocidad de giro constante, incluso en el caso de que se produzcan grandes variaciones de par mecánico, como consecuencia por ejemplo de cambios de viscosidad durante procesos de fermentación.

CONTROL DE pH

Para la medida y control de pH se utiliza un electrodo inmerso en el interior del tanque y en contacto con el contenido del reactor, al igual que la sonda de temperatura. El sistema *Biostat* implementa un controlador *PID* para el control de pH que opera en modo de rango partido. Se emplean dos bombas peristálticas que adicionan el agente corrector (ácido o base) en función de un punto de consigna prefijado. El control de las bombas incluye modulación de ancho de pulso.

COMUNICACIÓN POR PUERTO SERIE.

La unidad de control dispone de un interfaz *RS-422* que permite el control del equipo *Biostat* desde un ordenador. La comunicación entre el ordenador y el fermentador se realiza mediante un intercambio de mensajes que responden a un formato concreto. El manual de operaciones que acompaña al equipo explica cómo modificar parámetros de comunicación tales como velocidad de transferencia, longitud de datos o

dirección asignada a la subestación en el protocolo de comunicación. Sin embargo no hay información alguna sobre el formato en el que se transmiten los datos. En el Anexo II a esta Memoria se describe con más detalle las particularidades de la conexión serie y se incluye información detallada sobre el formato de transmisión así como los pasos seguidos para obtener esta información.

DISPOSITIVOS PERISTÁLTICOS

La unidad de control del equipo *Biostat* incorpora 4 bombas peristálticas para dosificación de reactivos. Estos dispositivos están asociados a determinados subsistemas de control, como por ejemplo las bombas que dosifican ácido y base para el control de pH, aunque también es posible manejarlos de forma individualizada. En el capítulo de *Resultados* se describe con más detalle el uso que se hace de estos dispositivos.

4.1.2 ELECTRODO DE pH

Para realizar el control de pH se dispone de un electrodo de cristal, marca Hamilton y modelo *Easyferm Plus K8*. Se trata de un dispositivo combinado que proporciona una diferencia de potencial medida entre el electrodo de referencia que contiene en su interior y el electrodo de medida, conformado por un hilo de plata recubierto de AgCl.

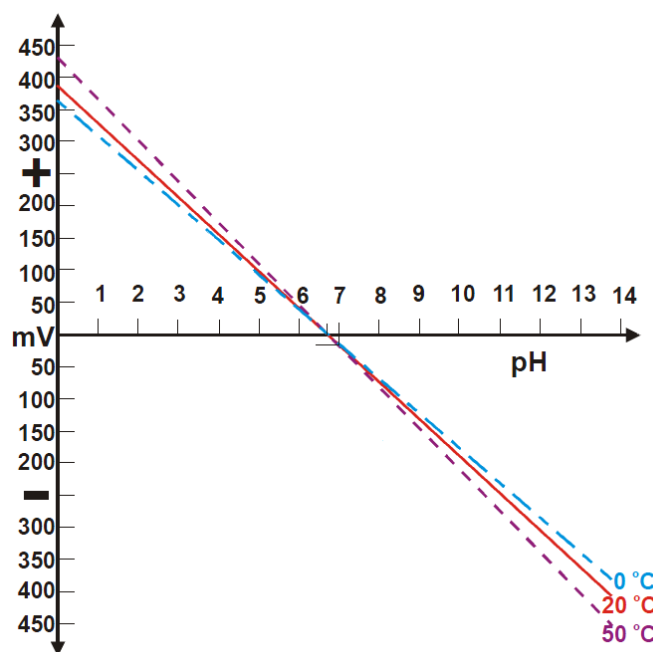


Figura 11 Recta de sensibilidad de electrodo de pH

Según la información que proporciona el fabricante el electrodo tiene un rango de medida de pH comprendido entre 0 y 14. La Figura 11 muestra la respuesta típica de este tipo de electrodos.

Como se puede apreciar, la respuesta del electrodo se corresponde con una línea recta, de pendiente negativa que relaciona variaciones de pH con variaciones de diferencia de potencial. Otra observación que puede hacerse es que la pendiente de la recta varía con la temperatura, por lo que hay que tener este dato en cuenta para la realización de medidas.

Las recomendaciones del fabricante de electrodos inciden en la alta impedancia de entrada que debe presentar el sistema de medida, superior a $10^{12} \Omega$.

4.1.3 MÓDULO TUBULAR DE MEMBRANA

El módulo tubular de membrana consiste en un tubo de acero inoxidable dispuesto para alojar en su interior una membrana polimérica o una membrana cerámica porosa (Figura 12).

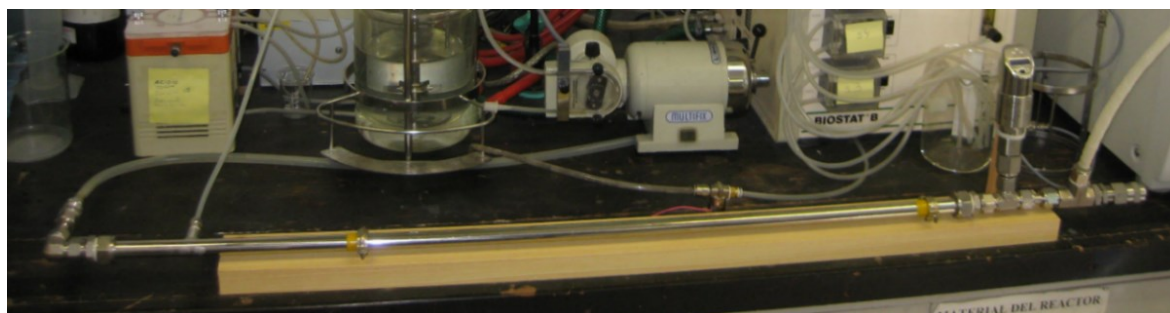


Figura 12 Reactor tubular de membrana

Se dispone de varios modelos de membranas de tamaño de corte molecular inferior a $1\mu\text{m}$. El modelo concreto a usar se elige en función de la barrera biológica a simular.



Figura 13 Detalle de membrana de filtración y salida de producto filtrado

En la Figura 13 se muestra la entrada del tubo, por la cual se inyecta el líquido que se desea filtrar. En dicha figura aparece extraída parte de la membrana para que se pueda apreciar su aspecto. También se muestra la salida por donde

se recoge el resultado de la diálisis. En el otro extremo, lugar por donde se recoge el producto sin filtrar, hay dispuesto un sensor de presión marca *Endress+Hauser*, modelo *PTP31*. No se dispone de interfaz de conexión entre este dispositivo y un ordenador, lo que dificulta su integración en un sistema automatizado.

La integración de este dispositivo tubular, junto con el sistema reactor de tanque agitado en un sistema de simulación global requiere la implementación de un conjunto de conductos y conexiones que conforman los circuitos hidráulicos que recibirán en adelante la denominación genérica de *circuito de impulsión* y *circuito de retorno*.

4.1.4 MEMBRANAS CERÁMICAS

Se han usado membranas inorgánicas de Al_2O_3 fabricadas por Atech Innovations GmbH. Estas membranas se caracterizan por las siguientes cualidades:

- Alta estabilidad térmica.
- Resistencia a productos químicos.
- Alta estabilidad mecánica.
- Fáciles de lavar.
- Alto rendimiento de filtrado.
- Se pueden regenerar.
- Bajo coste de operación gracias a su larga vida de servicio.

Código Diámetro

UF 50 N	0,05 μm
MF 20 N	0,2 μm

Tabla 1 Membranas cerámicas usadas

Cada elemento de filtración tiene un código de fabricación que hace referencia al diámetro medio de poro. La Tabla 1 muestra el código y el diámetro medio de poro que caracteriza a las dos membranas de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ que se han usado en los ensayos.

4.1.5 BOMBAS PERISTÁLTICAS

El uso de bombas peristálticas facilita el transporte de productos y reactivos sin que se produzca contacto físico entre los productos y los elementos de impulsión. Esto permite que no haya contaminación de los mismos por lo que constituyen un elemento ideal para la dosificación de reactivos y el control de flujos en los diversos circuitos hidráulicos que componen el sistema global.

Además de los dispositivos de dosificación que integra el sistema *Biostat*, en el laboratorio hay disponibles varios modelos de bombas peristálticas que sólo funcionan en modo manual y que se conectan a la tensión de red de 230 V.



Figura 14 Bomba peristáltica MP-3

La Figura 14 muestra el modelo *MP-3* de la marca EYELA, del cual se disponen varias unidades en el laboratorio. Esta bomba dispone de regulador de velocidad de giro, interruptor de encendido y selección del sentido de giro, sin embargo no presenta interfaz de control.

4.1.6 BALANZA DE PRECISIÓN

El Grupo de Investigación ha adquirido una balanza de precisión marca Sartorius, modelo *Quintix 5102* con conectividad *USB*. Dicha balanza puede pesar 5.100 g con una precisión de 10 mg.



Figura 15 Balanza de precisión

En el Anexo II se describen las particularidades del interfaz de comunicaciones que ha permitido integrar en las aplicaciones desarrolladas el registro de las medidas de peso realizadas en tiempo real.

4.1.7 SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS

En el diseño del prototipo simulador del tracto gastrointestinal se van a usar módulos de adquisición de datos de la familia *i-7000*, fabricados por ICP-CON, que se comunican con ordenador a través de un interfaz *RS-485*. Estos módulos suponen una solución económica y se cuenta con experiencia acerca de su uso. Aunque una solución basada en microcontrolador también habría sido factible,

un criterio que resultó decisivo en la elección adoptada es que los módulos con entradas analógicas elegidos disponen de convertidores analógico-digital de 24 bits, lo que supone una resolución mucho mayor que la disponible en soluciones basadas en microcontrolador de coste competitivo con respecto al de los módulos empleados.

Otro criterio a tener en cuenta es el mantenimiento posterior. Para el usuario del laboratorio resulta más cómodo que, en la medida de lo posible, los subsistemas empleados sean comerciales y de fácil sustitución en caso de fallos o averías.

Si bien el uso de un único controlador habría resultado tal vez más económico, guiándose por el criterio de implementar un sistema modular y flexible se va a optar por diferenciar los módulos relacionados con el control de pH de los módulos relacionados con el control de caudal y presiones. De este modo es posible implementar subsistemas que se comporten como instrumentos independientes y se consigue así más versatilidad para posteriores usos y aplicaciones en el laboratorio.

A continuación se comentan los módulos *i-7011*, *i-7017* e *i-7561*, por ser los modelos que más se adaptan a las necesidades del diseño y en el Anexo II se completa la información relativa al protocolo de comunicación y estructura de los mensajes enviados y recibidos entre el ordenador y estos módulos.

4.1.7.1 Módulo de adquisición de datos *i-7011*

La Figura 16.a muestra el aspecto del módulo *i-7011* y la Figura 16.b muestra el esquema de su estructura interna. Este módulo dispone de una entrada analógica, una entrada digital y dos salidas digitales.

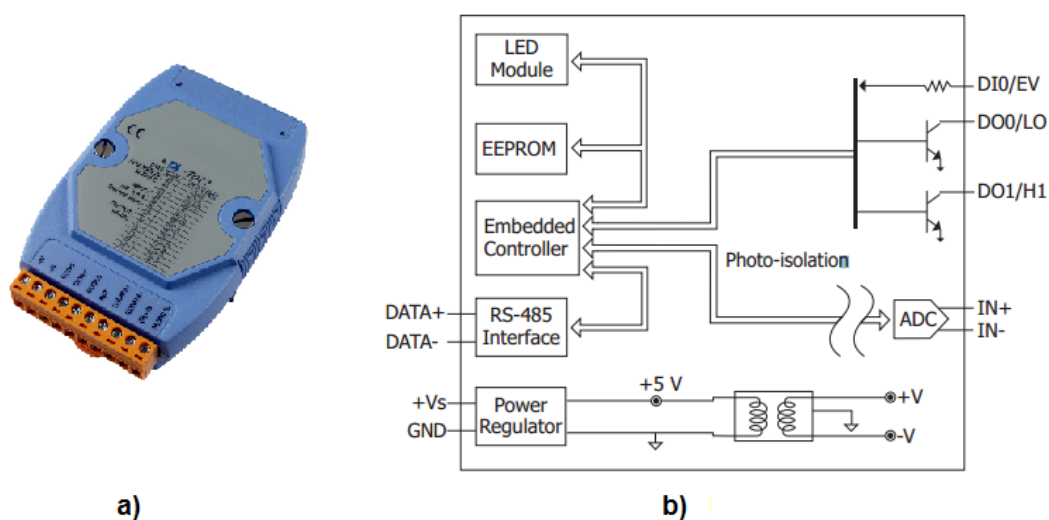


Figura 16 Módulo de adquisición de datos *i-7011*

El convertidor analógico-digital, *ADC*, es del tipo sigma-delta, tiene una resolución de 24 bits y se puede configurar su entrada, *IN*, para realizar medidas de corriente, tensión o entrada de termopar. Se puede programar el margen de tensión de entrada entre ± 15 mV y $\pm 2,5$ V, siendo el ancho de banda de 15,7 Hz. En este módulo las salidas digitales, *DO0/L0* y *DO1/H1*, son del tipo *colector abierto*. La intensidad máxima permitida por cada una de dichas salidas es de 30 mA.

La entrada digital, *DIO/EV*, es compatible con valores lógicos TTL y se puede configurar también como contador de eventos.

La alimentación, $+V_s$, debe estar comprendida entre los valores +10 y +30 V_{DC} y su consumo varía entre 0,9 y 1,5 W.

4.1.7.2 Módulo de adquisición de datos *i-7017*

La Figura 17.a muestra el aspecto de un módulo *i-7017* y la Figura 17.b muestra el esquema de su estructura interna.

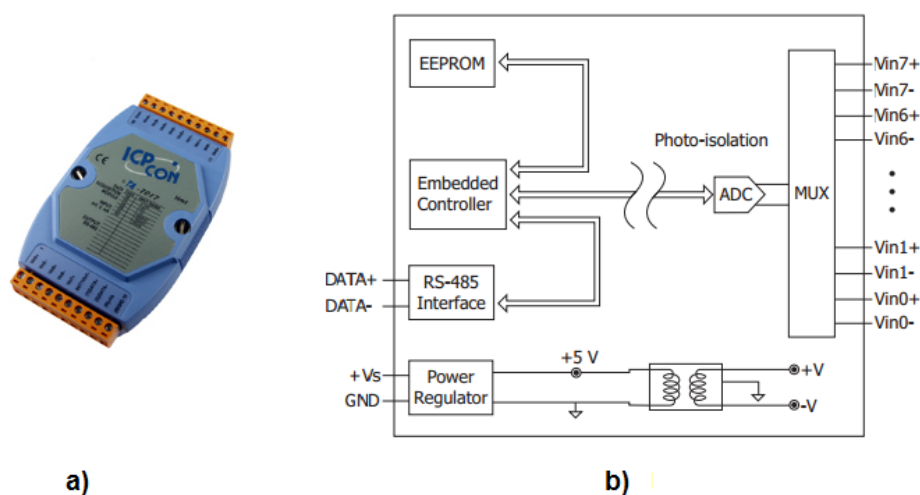


Figura 17 Módulo de adquisición de datos *i-7017*

Este módulo dispone de 8 entradas analógicas diferenciales, numeradas de *Vin0* a *Vin7*. De estas 8 entradas diferenciales se pueden configurar 2 de ellas como entradas sencillas. Todas las entradas analógicas se multiplexan a un único convertidor analógico-digital del tipo sigma-delta de 24 bits de resolución.

Se puede programar el margen de tensión de las entradas analógicas entre ± 150 mV y ± 5 V, siendo el ancho de banda de 15,7 Hz. Todas las entradas se configuran con el mismo rango.

La alimentación, $+V_s$, debe estar comprendida entre los valores +10 y +30 V_{DC} y su consumo medio es de 1 W.

4.1.7.3 Módulo interfaz USB-RS232/485/422 i-7561

La Figura 18.a muestra el aspecto de un módulo *i-7561* y la Figura 18.b muestra el esquema de su estructura interna.

Este módulo permite conectar dispositivos serie a sistemas provistos de interfaz *USB*. Dispone de puertos de comunicaciones *RS-232*, *RS-485* y *RS-422*. Incorpora un dispositivo ASIC que permite ajustar automáticamente sus parámetros internos a la velocidad de transferencia y niveles de señal de las comunicaciones, de modo que no necesita ser configurado.

Se alimenta directamente desde el bus *USB*, por tanto no requiere fuente de alimentación externa.

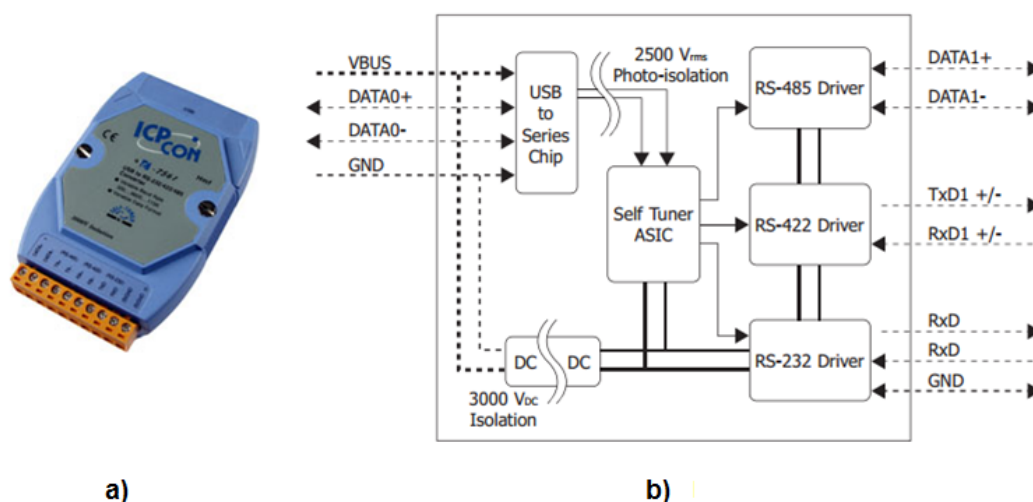


Figura 18 Módulo interfaz *i-7561*

4.1.8 ESPECTROFOTÓMETRO HELIOS-GAMMA

El Grupo de Investigación dispone de un equipo espectrofotómetro manual (Figura 19), marca Thermo, modelo *Helios Gamma* con lámpara de tungsteno. El monocromador tiene un rango espectral que abarca entre 325 y 1100 nm, con un ancho de banda de 2 nm.

Este equipo será usado durante la fase experimental para determinar la proporción de determinados compuestos presentes en el producto resultante del proceso de simulación. El procedimiento habitual a seguir es comparar las medidas de absorbancia de las muestras obtenidas con resultados previos de medidas en muestras que contienen los compuestos objeto de estudio diluidos en concentraciones conocidas.



Figura 19 Espectrofotómetro Helios gamma

En la Figura 20 se aprecia con más detalle el interior del compartimento de muestras del espectrofotómetro. Se ha dibujado una línea de color violeta para simular el haz de luz que se hace incidir sobre el portamuestras.



Figura 20 Compartimento de muestras del espectrofotómetro

Como se ha indicado, el equipo se usa en modo manual. Una vez colocada la muestra en el habitáculo correspondiente, se realiza la medida mostrándose los resultados obtenidos en el panel del instrumento.

4.1.9 ENTORNO DE PROGRAMACIÓN

El Departamento de Tecnología Electrónica dispone de licencias para el uso de diversos entornos de programación, las cuales son proporcionadas por el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga.

Las aplicaciones que hay que desarrollar durante esta Tesis Doctoral requieren del acceso a interfaces de comunicaciones, manejo de ficheros, capacidad de proceso de datos en tiempo real, interfaz gráfica de usuario, etc.

Hay varios entornos de programación muy usados en el Departamento mencionado y que satisfacen ampliamente estas especificaciones. Se ha optado

por utilizar el entorno *CVI* para desarrollar las aplicaciones informáticas que facilitan la automatización de procesos.

CVI es un entorno de desarrollo integrado para programadores en lenguaje C, suministrado por la corporación National Instruments y que cuenta con una amplia librería de funciones matemáticas, de comunicaciones, manejo de ficheros, etc. Emplea técnicas de programación orientada a eventos y dispone de herramientas para diseño de interfaces de usuario basadas en paneles de control gráficos.

El entorno *CVI* además de generar ficheros ejecutables ofrece la posibilidad de generar kits de distribución que instalan dichos programas ejecutables y las librerías necesarias para su ejecución en cualquier ordenador. De este modo se hace posible el uso de estas aplicaciones en futuros ordenadores que reemplacen a los que se usan actualmente.

4.1.10 EQUIPOS COMPLEMENTARIOS

4.1.10.1 Homogeneizador

El Grupo de Investigación de Nanotecnología y Síntesis Orgánica dispone en sus instalaciones de la Universidad de Málaga de un homogeneizador dispersador modelo *Silentcrusher-m* (Figura 21). Dicho homogeneizador es utilizado por los investigadores de dicho grupo para la preparación de nanopartículas lipídicas.



Figura 21 Homogeneizador *Silentcrusher-m*

Este instrumento se usa para dispersar, emulsionar, homogeneizar y producir suspensiones en medios líquidos, líquido-sólidos o en fase gaseosa. La rotación de los útiles de dispersión imantados se produce por inducción magnética. Está diseñado para volúmenes entre 0,8 y 2.000 mL, según el útil de dispersión usado como accesorio. La velocidad se regula entre 5.000 y 26.000 rpm.

4.1.10.2 Cromatógrafo de gases -Espectrómetro de masas

La Universidad de Málaga cuenta con un centro denominado Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI). Este centro está destinado a dar soporte científico-técnico a los diferentes grupos de investigación universitarios, así como a instituciones públicas y empresas privadas.

Entre los servicios ofertados por el SCAI se encuentra la Unidad de Espectrometría de Masas. Dicha Unidad cuenta con diversos equipos que utilizan técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Se han requerido los servicios de la Unidad de Espectrometría de Masas para analizar muestras obtenidas durante los ensayos con nanopartículas, tal como se describe en el capítulo de *Resultados*. Para analizar estas muestras, el personal técnico adscrito a dicha Unidad ha utilizado los equipos que se indican a continuación:

- Cromatógrafo de Gases *Trace GC Ultra* (Thermo Scientific S.L.) acoplado a Espectrómetro de Masas de cuadrupolo *DSQ* (Thermo Electron Corporation) y automuestreador *Triplus AS*. Para analizar las muestras se utiliza una sonda DEP-MS. Para referirse a los resultados de los análisis realizados por esta unidad se usarán en adelante los términos de *DEP-MS* o *ESI-MS*.
- Cromatógrafo de Gases *Trace GC Ultra* acoplado a Espectrómetro de Masas de trampa iónica Orbitrap, *Q-Exactive* (Thermo Scientific S.L.). Ionización mediante sonda de ionización de electrospray calentado. Para referirse a los resultados de los análisis realizados por esta unidad se usará en adelante el término *HESI-MS* ó *ESI alta resolución*.

4.2 REACTIVOS

Este subcapítulo se divide en varias partes diferenciadas. En primer lugar se hace referencia a los reactivos empleados para simular los fluidos corporales. En segundo lugar se exponen los reactivos que han intervenido en la preparación de determinados compuestos basados en nanopartículas lipídicas que han sido objeto de estudio en los ensayos. En tercer lugar se relacionan otros compuestos que también han sido usados en algunos ensayos.

4.2.1 REACTIVOS USADOS PARA LA SIMULACIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Para la simulación de los fluidos corporales se han elegido una serie de compuestos, dando mayor importancia a aquellos que tienen una mayor incidencia en la descomposición de la materia.

Los jugos gástricos se han simulado con HCl 1M. El caudal de dosificación que emula la secreción gástrica es de 0,3 mL/min (Ewe, 1869; Sumeri, 2008).

Para simular los jugos pancreáticos se emplea fundamentalmente NaHCO₃ 1M dosificado a 4,5 mL/min (Sumeri, 2008). Los jugos biliares se han simulado con una disolución de sales biliares en agua milliQ, a razón de 4mg/mL (Sumeri, 2008). Las sales biliares usadas tienen la referencia B8756 FLUKA. El caudal de dosificación usado habitualmente es 4 mL/min. En determinados ensayos interesa simular la secreción de lipasa pancreática; para ello se usa el compuesto L3126-25G, suministrado por Sigma-Aldrich. Este compuesto se puede dosificar disuelto en la misma disolución usada para las sales biliares, usando una concentración de 1 mg/mL (Ahmed, 2012).

Durante la fase de absorción también se simula la secreción de base en el intestino delgado. Para ello se ha usado NaHCO₃ 1M.

			Concentración
ESTÓMAGO	HCl		1 M
DUODENO	Jugos pancreáticos	NaHCO ₃	1 M
		Lipasa pancreática L3126-25G Sima-Aldrich	1 mg/mL
	Sales Biliares	B8756 FLUKA	4 g/mL

Tabla 2 Reactivos que simulan fluidos gastrointestinales

En la Tabla 2 se resume los órganos simulados con los reactivos usados y la concentración/dilución de los mismos.

4.2.2 REACTIVOS USADOS PARA LA PREPARACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS LIPÍDICAS.

Se han usado dos lípidos que han sido denominados genéricamente como *Lípido-E* y *Lípido-P* para proteger la confidencialidad de datos.

La fórmula molecular del *Lípido-E* es $C_{57}H_{110}O_6$ y ha sido adquirido en la casa comercial Fluka. La estructura de este compuesto se muestra en la Figura 22a. El otro lípido que se utiliza para la preparación de nanopartículas lipídicas es el denominado *Lípido-P*, cuya estructura se muestra en la Figura 22b. Su fórmula molecular corresponde a $C_{51}H_{98}O_6$ y ha sido adquirido también a Fluka.

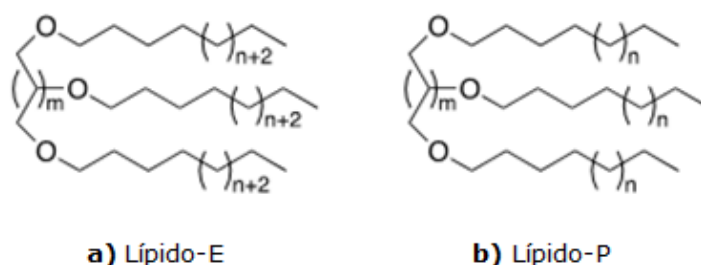


Figura 22 Triglicéridos empleados en la preparación de nanopartículas lipídicas

La diferencia que existe entre estos glicéridos es el número de carbonos de los ácidos grasos que los constituyen. *Lípido-E* cuenta con mayor número de átomos de carbono que *Lípido-P*, lo que conlleva que *Lípido-E* tenga mayor punto de fusión ($\approx 73\text{ }^{\circ}\text{C}$) que *Lípido-P* ($\approx 66\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Se ha utilizado la lecitina de yema de huevo que contiene un 60% de *L-α-fosfatidilcolina* (PC) como tensioactivo. Su estructura molecular se puede observar en la Figura 23 y es suministrada también por la casa comercial Fluka (Ref. 61755).

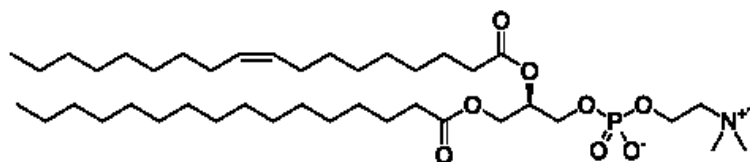


Figura 23 Estructura de *L-α-Fosfatidilcolina* (PC)

Tween[®]80 es otro de los tensioactivos utilizados y que fue adquirido en Sigma-Aldrich (Ref. P1754). También se utilizó un codisolvente, *n*-butanol.

4.2.2.1 Macelignano

Macelignano es un lignano sólido cuya estructura se muestra en la Figura 24 y presenta la fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_4$. Este producto, cuya masa molecular es de 328,40 g/mol, se encuentra en *Myristica fragrans* de cuya familia procede la nuez moscada.

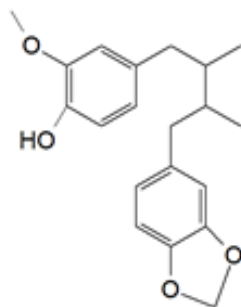


Figura 24 Estructura de macelignano

Existen estudios que avalan sus propiedades anticancerígenas y anti-inflamatorias y como posible tratamiento del Alzheimer (Paul, 2013), sus propiedades antibacterianas en la higiene bucal (Salazar, 2009) o su efectividad antibacteriana comparada con especies similares (Cheng, 2005). Recientes estudios sugieren que el macelignano facilita la biodisponibilidad del paclitaxel y mejora su efectividad (Qiang, 2010).

4.2.2.2 Taxol®

El Taxol® es el nombre químico de *paclitaxel* (Figura 25). Se encuentra en la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* (Soto, 2000; Laza, 2003). Este compuesto es un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer (Di Constanzo, 2004).

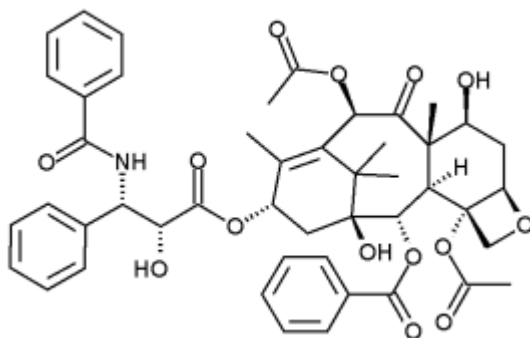


Figura 25 Estructura de Taxol

En 1992 la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos aprobó el uso de Taxol® en pacientes con cáncer de ovario y en 1994, en pacientes con

cáncer de pecho. Otras neoplasias que responden al Taxol® incluyen ciertos tipos de cáncer pulmonar y melanomas de estómago (Cobo, 2006).

Taxol® es prácticamente insoluble en soluciones acuosas; por este motivo actualmente se utiliza disuelto en un tensioactivo llamado Cremophor® para tratamientos de quimioterapia contra el cáncer (Sparreboom, 1996). El problema es que esta mezcla produce efectos secundarios nocivos sobre el paciente, de ahí el interés de vehiculizar Taxol® en nanopartículas lipídicas, lo que además permitiría una liberación gradual del compuesto activo y de esta forma menos efectos secundarios.

4.2.3 OTROS REACTIVOS

Se han realizado ensayos con antioxidantes y colorantes con el objeto de que sirvan de referencia para el estudio de compuestos con pesos moleculares similares y en aplicaciones como sustancias guías. Los compuestos empleados han sido los siguientes:

β-caroteno. Suministrado por Chr. Hansen, con el código 697190 bajo el nombre de *Beta Carotene*. La Figura 26 muestra su estructura. La fórmula molecular es $C_{40}H_{56}$ y el peso molecular es de 536,87 g/mol.

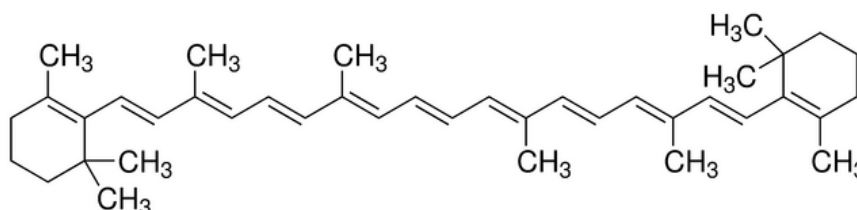


Figura 26 Estructura del β-caroteno

Ácido carmínico. Suministrado por Chr. Hansen, con el código 704299 bajo el nombre de *Red Strawberry Fragaria 100 WS*. La Figura 27 muestra su estructura. La fórmula empírica es $C_{22}H_{20}O_{13}$ y el peso molecular es de 492,39 g/mol.

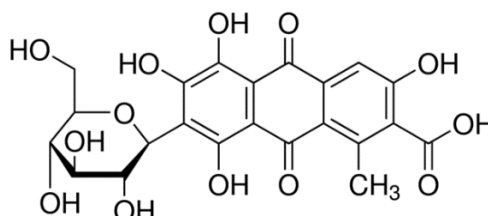


Figura 27 Estructura del ácido carmínico

5.- RESULTADOS

5 RESULTADOS

Este capítulo se divide en tres partes. En la primera parte se plantea la arquitectura del sistema, los subsistemas que la componen y el uso que se hace del equipamiento disponible, para seguidamente describir el desarrollo tanto hardware como software. En una segunda parte se describen las medidas, pruebas y ensayos realizados con el objeto de verificar el buen funcionamiento del prototipo desarrollado. En la tercera parte se detallan ensayos relacionados con las aplicaciones del sistema. Si bien son múltiples los campos de investigación en los que resulta útil la simulación in vitro, en los ensayos realizados se han priorizado aplicaciones relacionadas con la efectividad de la micro/nanoencapsulación de principios activos, por ser este un ámbito de investigación de gran relevancia en la actualidad y en el que los métodos de estudio in vitro resultan de gran aplicación.

5.1 DESARROLLO

Los siguientes apartados describen las diversas etapas que han concluido con la implementación física del prototipo simulador del tracto gastrointestinal. Aunque han concurrido de forma simultánea en el tiempo, para su mejor comprensión se han diferenciado estas etapas en una fase de desarrollo hardware y otra fase de desarrollo software.

La descripción del desarrollo hardware se inicia con un conjunto de consideraciones previas a la descripción de la arquitectura del modelo del sistema a desarrollar, relacionadas con el uso que se ha hecho de los recursos disponibles. Tras exponer la arquitectura del sistema se explica el proceso seguido para el desarrollo e implementación de los subsistemas de control de pH y medida de presión. Seguidamente se expone el esquema que representa el

conjunto implementado, para finalizar con una serie de aclaraciones acerca de conexiones y controles de caudal y presión. Estos apartados se complementan con el Anexo II que describen con más detalle las conexiones y los interfaces entre los distintos subsistemas.

La descripción del desarrollo software incluye consideraciones acerca del uso que se ha hecho de las herramientas de programación. Se describen las peculiaridades de los ficheros de configuración y datos y se comentan los algoritmos y funciones de control que se han considerado más relevantes. Por último se exponen los principales programas desarrollados. Esta exposición se complementa con el Anexo IV, en el que se recopila los manuales de usuario de las aplicaciones desarrolladas.

5.1.1 CONSIDERACIONES PREVIAS

5.1.1.1 Sistema modular y flexible

El prototipo simulador se compone de un conjunto de medios y equipos disponibles en el laboratorio de Tecnologías de Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad de Granada que deben usarse de forma simultánea y controlada. Dada la complejidad del sistema gastrointestinal, la diversidad de alimentos o fármacos susceptibles de ensayar y la cantidad de variables a monitorizar, se impone la conveniencia de idear un sistema modular y flexible que permita el intercambio de elementos en un momento dado.

5.1.1.2 Control de pH

Como ya se indicó en el capítulo anterior, el sistema *Biostat* incorpora su propio subsistema para controlar el pH del tanque reactor, basado en un electrodo que proporciona información sobre la acidez o alcalinidad del medio de reacción y dos bombas peristálticas (identificadas como *S3* y *S4*) que dosifican ácido o base según proceda. Este sistema presenta varios inconvenientes.

- Durante un mismo proceso de regulación, una vez establecido el valor de consigna, el sistema dosifica de forma automática tanto ácido como base, dependiendo de la salida proporcionada por un control *PID*. Esto supone un contratiempo pues en los ensayos a realizar no se debe dosificar simultáneamente los dos reactivos citados.
- Los ensayos previstos se basan en procesos de simulación de secreciones enzimáticas que se caracterizan por valores de caudal muy bajos, inferiores a los valores mínimos de dosificación contemplados por el sistema.

Por estos motivos se ha optado por implementar un sistema propio de control de pH. Este sistema emplea el mismo electrodo pero actúa sobre bombas

independientes que dosifican ácido o base, según la glándula cuya secreción se desee simular y en el orden establecido por el usuario. Los dispositivos de dosificación de ácido (*S3*) y base (*S4*) del equipo *Biostat* se podrán usar para otras funciones.

Una buena solución para el desarrollo de este sistema de control de pH alternativo es el uso de un módulo de adquisición de datos *i-7011*. Este módulo dispone de una entrada analógica y dos salidas digitales, entre otras prestaciones, por lo que resulta útil como elemento de control para la regulación de pH.

5.1.1.3 Circuitos hidráulicos

En un principio se pensó en regular el flujo de caudal por los circuitos hidráulicos combinando bombas y electroválvulas pero se comprobó en ensayos con productos viscosos o con grumos se producían obturaciones en los orificios de las electroválvulas. Así pues, se ha optado por recurrir a bombas peristálticas tanto para dosificar reactivos como para controlar y regular los caudales.

Una de las principales ventajas de las bombas peristálticas es que el fluido manipulado no entra en contacto con los elementos de impulsión y por lo tanto no hay contaminación ni interacción química entre las partes. Otra ventaja es que con el avance o detención, se regula el flujo o bloqueo, respectivamente, del circuito hidráulico, pudiendo prescindir así de las electroválvulas.

El sistema *Biostat* dispone de cuatro dispositivos peristálticos. Las bombas denominadas genéricamente como *S1* y *S2* permiten configurar su ciclo de trabajo enviando el comando adecuado. Estas bombas se han considerado apropiadas para actuar sobre los circuitos hidráulicos de impulsión y de retorno, como se verá más adelante. Las bombas *S3* y *S4* son complementarias y se activan ambas con el mismo comando pero distinto parámetro. Puesto que no se van a usar para la regulación de pH, son apropiadas para la dosificación de otros reactivos. Hay circunstancias en las que interesa aplicar una velocidad de dosificación muy baja para un reactivo, inferior a la mínima que es capaz de proporcionar el equipo *Biostat* en modo automático. En tal caso, el control recae sobre el ordenador, que mediante el envío de los comandos adecuados, permite activar el dispositivo peristáltico durante intervalos muy pequeños, cada cierto tiempo.

Para dosificar ácido y base se emplean respectivamente dos bombas EYELA, modelo *MP-3*. Como estos dispositivos no disponen de interfaz se han implementado circuitos de conmutación de estado sólido activados por las salidas digitales del módulo de control. Estos dispositivos de conmutación aplican tensión o no a las bombas, también durante pequeños intervalos de tiempo.

La dosificación de reactivos y transporte de producto entre reactores se ha resuelto mediante el empleo de tubos flexibles de silicona, de sección interior y diámetro exterior acordes con las características de las bombas peristálticas. En los casos que se precisa, se emplean conexiones de cristal, por tratarse de un material inerte, o acoplamientos rápidos, de un cuarto de pulgada de la serie *PLC*, distribuidos por el fabricante *Colder Products*.

5.1.1.4 Medida de presión

El reactor tubular dispone de un sensor de presión acoplado a la salida de recirculación de producto no filtrado. El rango de medidas de este dispositivo se encuentra entre presiones de 0 a 40 bar, mientras que los valores de presión que se espera manejar en las aplicaciones habituales se miden en milibares. Pero el principal inconveniente de este sensor es que, si bien dispone de conexión específica para interfaz con ordenador, no ha sido posible conseguir el adaptador necesario para dicha conexión.

En consecuencia, se ha optado por desarrollar un sistema de medida de presión propio, cuyas características se detallan en apartado posterior. Se mantiene el dispositivo ya existente como medida de referencia en operaciones auxiliares de calibración y tareas de inspección visual y diagnóstico del sistema.

También se pensó en un primer momento en emplear dos elementos de medida de presión, uno para el circuito de impulsión y otro para el circuito de retorno. La experiencia ha demostrado que el sensor de presión del circuito de impulsión no proporciona información relevante, por tanto se puede prescindir de él, aunque puede resultar útil como elemento de referencia para opciones de chequeo y detección de errores. En la redacción de esta Tesis Doctoral se emplean esquemas y diagramas que solo muestran un sensor de presión colocado en el circuito hidráulico de retorno, mientras que los programas desarrollados contemplan la posibilidad de una segunda lectura analógica.

El módulo de adquisición de datos *i-7017* dispone de ocho canales analógicos de entrada de ganancia programable. Por tanto resulta útil para medir uno o varios valores de presión y admite la posibilidad de integrar más medidas, conforme surjan nuevas necesidades. Incluso en un momento dado, también se podría usar este módulo para la lectura de pH, satisfaciendo así la exigencia de flexibilidad en el diseño.

Se pueden usar otros módulos compatibles con el anterior que incorporen varias entradas analógicas, como por ejemplo los modelos *i-7015* o *i-7018*, todos ellos de la misma familia de módulos de adquisición de datos ofertada por la corporación ICP-DAS.

5.1.2 ARQUITECTURA

En el esquema de la Figura 28 se indica el conjunto de elementos principales que conforman el prototipo simulador. El conjunto se completa con un ordenador que controla todos los elementos.

En el esquema mostrado se aprecian los dos elementos fundamentales. Estos son el reactor de tanque agitado y el módulo de filtración. Así mismo se observan los siguientes elementos auxiliares:

- Como elementos de dosificación de reactivos (1) se usan los dispositivos del equipo *Biostat* denominados genéricamente *S3* y *S4*. Estas bombas permiten simular la segregación de diversos fluidos corporales durante diversas fases de la simulación.
- El electrodo de pH (2) inmerso en el tanque reactor se conecta al subsistema de control de pH que a su vez actúa sobre las bombas dosificadoras de ácido y base (3). Este subsistema de control de pH permite simular la acción de los jugos gástricos y los procesos de regulación de pH que se llevan a cabo, tanto en el estómago como en el duodeno y resto del intestino delgado.
- Se usan dos bombas peristálticas, implementadas por los dispositivos *S1* y *S2* del equipo *Biostat*. Una bomba (4) impulsa el contenido del tanque agitado al reactor de membrana, y la otra (5) regula el retorno de producto no filtrado al tanque agitado. El uso de estas bombas, además de ser necesario para el control de caudal y de presión, permite simular el desplazamiento del quimo a lo largo del sistema digestivo.
- Una sonda de temperatura (6) que se encuentra inmersa en el contenido del tanque agitado se conecta al subsistema de control de temperatura que incorpora el equipo *Biostat* y que actúa sobre el circuito térmico (7) que enfría/calienta el agua de recirculación de la camisa del vaso reactor, permitiendo regular la temperatura del contenido del tanque. Se simula así la temperatura corporal.
- El equipo *Biostat* también incorpora elementos del control del motor (8) que actúa sobre las paletas de la turbina de agitación (9). Estos elementos, en conjunción con las bombas peristálticas (4) y (5), simulan la motilidad gastrointestinal.
- La cantidad de producto absorbido se evalúa pesando (10) la salida filtrada de la membrana. Para ello se recurre a una balanza de precisión.
- Por último, se ha implementado un subsistema para medir la presión (11), el cual es necesario para el control de caudales y como referencia de los algoritmos empleados para la regulación de la presión en los conductos hidráulicos.

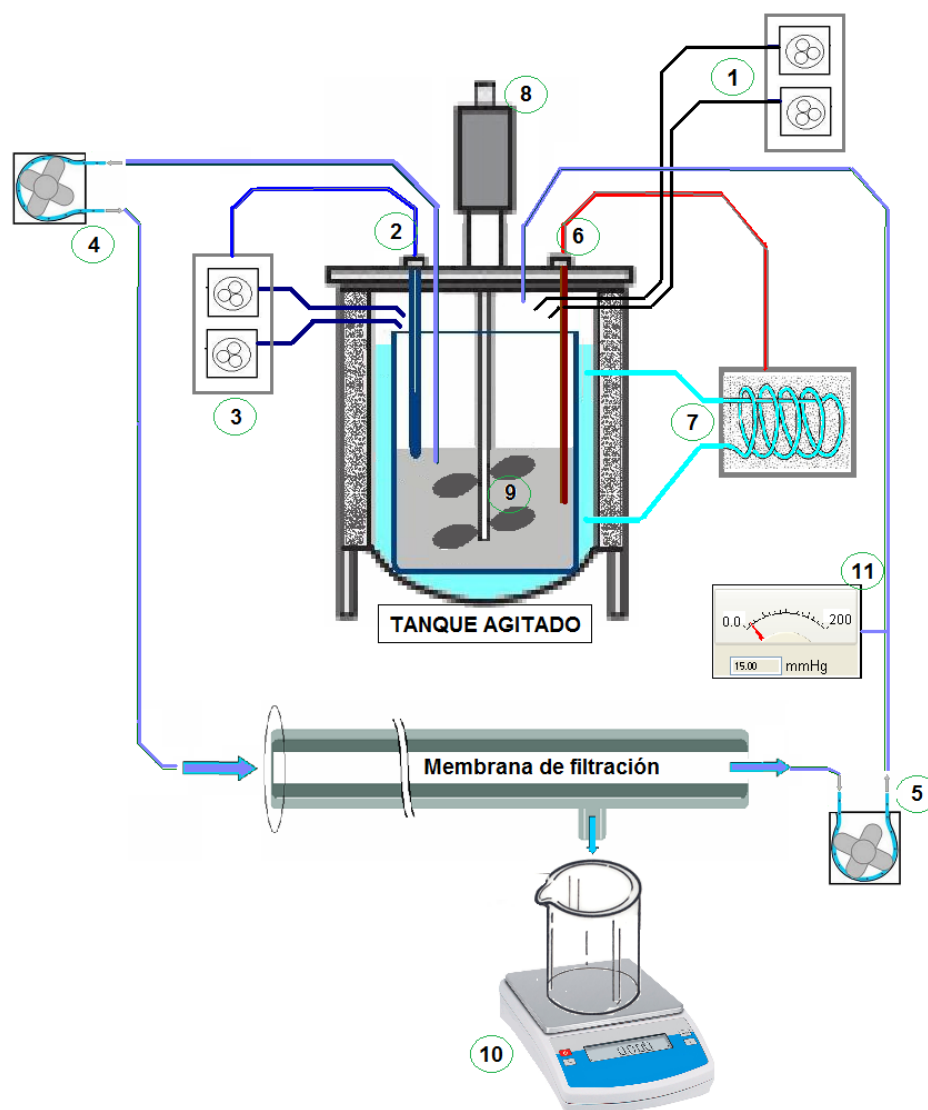


Figura 28 Arquitectura del prototipo simulador del tracto gastrointestinal

5.1.3 SUBSISTEMA DE CONTROL DE pH

5.1.3.1 Medida de pH

Para diseñar el circuito amplificador de acondicionamiento eléctrico de la medida de diferencia de potencial que proporciona el electrodo de pH se sigue una recomendación fundamental del fabricante: el sistema de medida debe tener una impedancia de entrada muy alta, superior a $10^{12} \Omega$, y muy baja capacidad (del orden de pF). Con este criterio, se practica una búsqueda de circuitos amplificadores de muy alta impedancia de entrada de los principales fabricantes de dispositivos para instrumentación electrónica. La Figura 29 muestra tres

ejemplos de notas de aplicación de circuitos amplificadores válidos para este propósito que aparecen en las hojas de características que son proporcionadas por sus respectivos fabricantes.

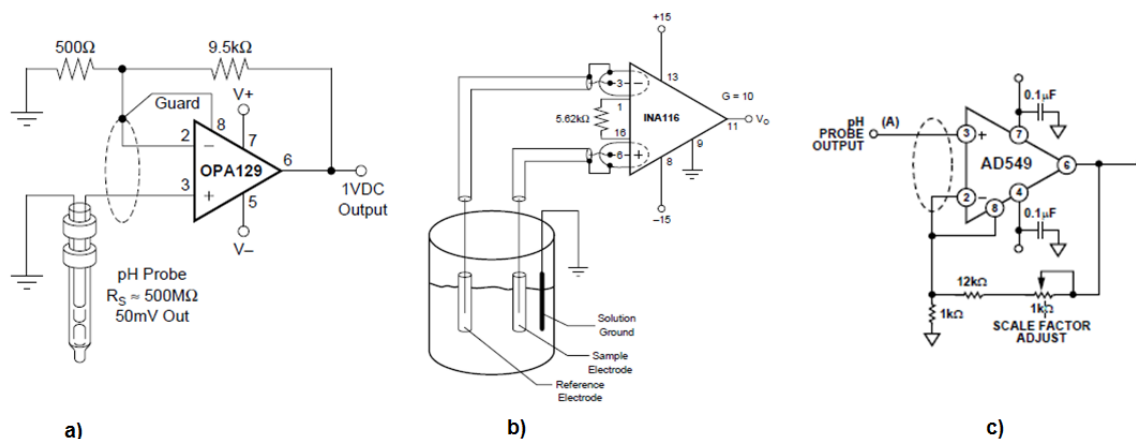


Figura 29 Ejemplos de aplicación de amplificadores de muy alta impedancia de entrada para medida de pH

La Figura 29a muestra la nota de aplicación para medida de pH del amplificador operacional *OPA129* (Texas Instruments, Burr-Brown). La Figura 29b muestra la nota de aplicación del amplificador de instrumentación *INA116* (Texas Instruments, Burr-Brown) para medidas de pH y conductividad. La Figura 29c muestra la nota de aplicación para medida de pH del amplificador operacional *AD549* de Analog Devices.

Los tres componentes seleccionados presentan valores similares de impedancia de entrada, de $10^3 \Omega // 1 \text{ pF}$. Por motivos de disponibilidad, y que el tipo de encapsulado resulte de fácil manipulación, se elige el circuito basado en el amplificador *AD549* configurado como amplificador no inversor. Además, este dispositivo incluye ajuste de la tensión de *offset*.

La Figura 30 muestra el circuito de acondicionamiento de señal completo, incluyendo un potenciómetro para ajuste de *offset* sugerido también en las notas de aplicación del circuito, y fuente de alimentación lineal de $\pm 9 \text{ V}$. La entrada V_{in} se conecta al electrodo y la salida V_{out} se aplica al módulo de adquisición de datos.

Está previsto que durante los ensayos no se produzcan variaciones térmicas, por tanto no se ha considerado necesario incluir circuito de compensación de variaciones de la medida de pH por efecto de variaciones de temperatura.

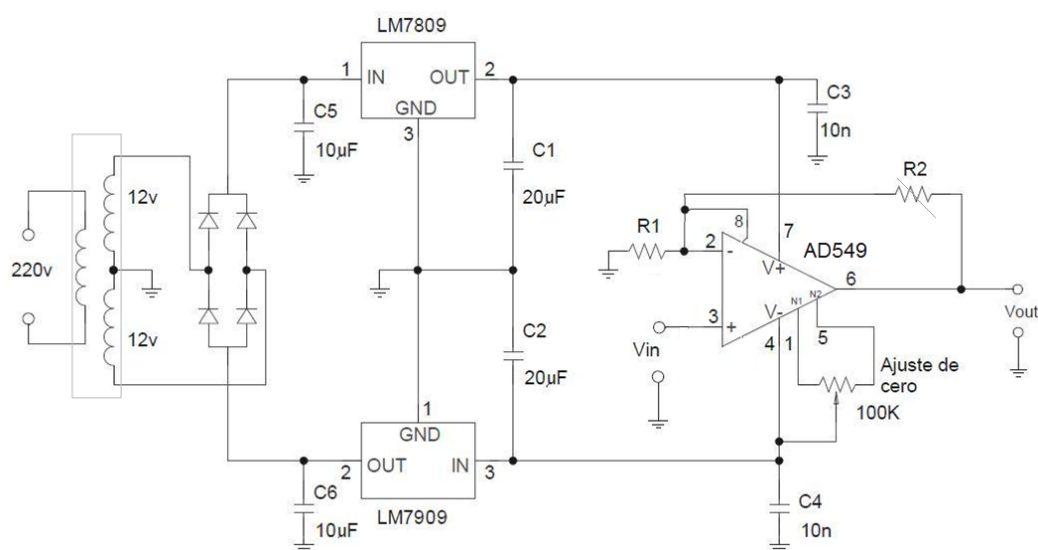


Figura 30 Acondicionamiento de señal para lectura de pH

La resistencia R_1 se adopta de $1\text{ k}\Omega$, y para la resistencia R_2 se emplea un potenciómetro de $10\text{ k}\Omega$ con lo que se obtiene ganancia variable entre 1 y 11.

$$V_{out} = V_{in} \left(1 + \frac{R_2}{R_1} \right) \rightarrow A = \frac{V_{out}}{V_{in}} = 1 + \frac{10\text{ k}\Omega}{1\text{ k}\Omega} = 11 \quad (1)$$

De esta forma, la posibilidad de variar la ganancia de amplificación, combinada con la opción de modificar el margen de medida del módulo *i-7011*, amplía las posibilidades de uso, posibilitando el empleo de diferentes modelos de electrodo si surgiera la necesidad, o el uso del sistema para otros tipos de medidas a realizar en el laboratorio y que requieran de alta impedancia de entrada en el equipo de lectura.

El circuito se ha implementado en una *PCB* (placa de circuito impreso) a simple cara. Para el diseño de esta placa se ha utilizado el software gratuito *DesignSpark PCB*.

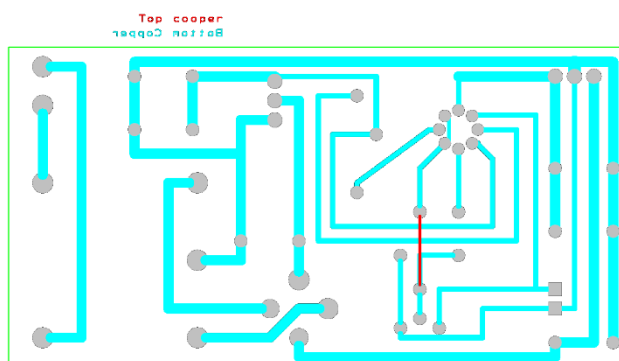


Figura 31 PCB de acondicionamiento de electrodo de pH (pistas)

Este diagrama de conexión ilustra la configuración de un sistema de audio que incluye un amplificador de potencia. Los componentes y sus conexiones son los siguientes:

- Transformador:** Un transformador con una entrada de 230 V y una salida de 230 / 12+12 V.
- Rectificador:** Un puente rectificador que convierte la salida del transformador en corriente continua. Las salidas están etiquetadas como +V, -V y 0V.
- Resistencias:** Se utilizan resistencias R1, R2, R3 y R4 para ajustar el nivel de señal y la potencia.
- Capacitores:** Se utilizan capacitores C1, C2, C3, C4 y C5 para filtrar la corriente y estabilizar la tensión.
- Amplificador de potencia:** El núcleo del sistema, que recibe la señal de entrada y la amplifica para impulsar los altavoces.
- Salida:** La salida final del sistema, etiquetada como SALIDA, que se conecta a los altavoces.

Las conexiones se realizan de la siguiente manera:

- La salida de 230 V del transformador se conecta al puente rectificador.
- La salida de 230 / 12+12 V del transformador se conecta al puente rectificador.
- La salida +V del puente rectificador se conecta al capacitor C1.
- La salida -V del puente rectificador se conecta al capacitor C2.
- La salida 0V del puente rectificador se conecta al capacitor C3.
- La salida +V del capacitor C1 se conecta al terminal +Vin del amplificador de potencia.
- La salida -V del capacitor C2 se conecta al terminal -V del amplificador de potencia.
- La salida 0V del capacitor C3 se conecta al terminal 0V del amplificador de potencia.
- La salida +Vin del amplificador de potencia se conecta al terminal +V del capacitor C4.
- La salida -V del capacitor C4 se conecta al terminal -V del amplificador de potencia.
- La salida 0V del capacitor C4 se conecta al terminal 0V del amplificador de potencia.
- La salida +V del capacitor C5 se conecta al terminal +V del amplificador de potencia.
- La salida -V del capacitor C5 se conecta al terminal -V del amplificador de potencia.
- La salida 0V del capacitor C5 se conecta al terminal 0V del amplificador de potencia.
- La salida +V del amplificador de potencia se conecta al terminal +V del capacitor C6.
- La salida -V del capacitor C6 se conecta al terminal -V del amplificador de potencia.
- La salida 0V del capacitor C6 se conecta al terminal 0V del amplificador de potencia.

Analizando las curvas de transferencia del electrodo se deduce que a una variación de pH entre 2 y 12 le corresponde una variación de diferencia de potencial en el electrodo en torno a 700 mV. Se ha ajustado la ganancia del amplificador (variando la relación entre R_1 y R_2) en torno a 2, de modo que la variación de tensión prevista es de 1,5 voltios a la entrada analógica del módulo de adquisición de datos. Esto es, la entrada variará entre +750 mV (pH bajo) y -750 mV (pH alto), por lo que el rango de medida aconsejado para el módulo a usar es el de ± 1 V. (Siempre se deja un poco de margen útil para las operaciones de ajuste y calibración inicial).

$$pH = 7 - 0,00666 \cdot x \quad (2)$$

Según especificaciones, el amplificador *AD549* tiene un ruido de $4 \mu\text{V}_{\text{p-p}}$ para bajas frecuencias (0,1 a 10 Hz). Para un fondo de escala de 2 V, este error de medida convertido a bits efectivos es:

$$2^N = \frac{2V}{4\mu V} \rightarrow N = 18,9 \quad (3)$$

Este valor se redondea al valor entero inferior. Aunque la conversión de valores analógicos a valores digitales se realiza con un convertidor sigma-delta de 24 bits, la resolución efectiva, teniendo en cuenta el error de amplificación es:

$$\text{resolución} = \frac{2V}{2^{18}} = 0,00763mV = 7,63\mu V \quad (4)$$

Aplicando la ecuación (2) de la recta de carga, una variación de pH 0,01 se corresponde con una variación de tensión de 1,5 mV. Puesto que la resolución vista anteriormente (expresión 4) es un valor muy inferior, se deduce pues que el sistema desarrollado es perfectamente válido para realizar medidas de pH con dos decimales.

5.1.3.2 Actuación sobre bombas de ácido-base

En una primera implementación, aprovechando las dos salidas digitales del módulo de control usado, se recurrió a un circuito interfaz basado en relés para el control de las bombas peristálticas disponibles en el laboratorio. El uso de relés constituye una solución universal que permite utilizar cualquier tipo de carga a la salida, proporcionando flexibilidad al control. Los primeros ensayos preliminares permitieron comprobar que la conexión y desconexión de las bombas provocaba ruido eléctrico y perturbaciones que en determinadas circunstancias interfería en las medidas de pH. Es por ello que se ha desarrollado un segundo circuito interfaz basado en componentes de estado sólido (triacs y optoacopladores) que además de mejorar la eficiencia presentan la ventaja de un tiempo de conmutación más rápido.

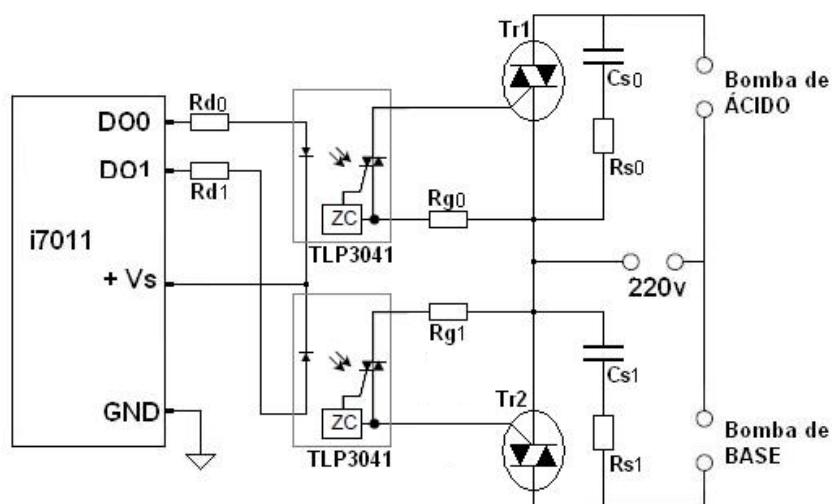


Figura 33 Circuito interfaz de control de estado sólido

La solución propuesta se basa en el dispositivo *TLP3041*. Se trata de un optotriac con detección de “cruce por cero”, que a su vez dispara a un triac que permite conmutar mayor potencia (Figura 33).

La Figura 34 muestra el aspecto final de la placa interfaz. Al igual que la placa de acondicionamiento de señal, ha sido diseñada usando el software *DesignSpark PCB* y para el trazado de las pistas se ha usado la máquina fresadora del Departamento de Tecnología Electrónica de la Universidad de Málaga.

En el diseño se han considerado las medidas oportunas para poder adaptar dicha placa a la regleta de conexionado del módulo de control, a fin de simplificar conexiones.

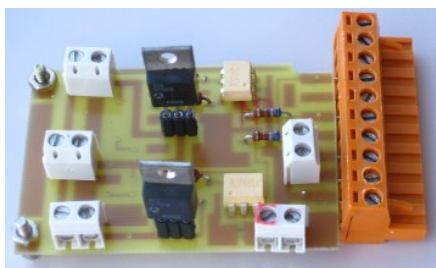


Figura 34 Placa interfaz de control

5.1.3.3 Ensamblaje final

Se ha dispuesto una caja para alojar los circuitos diseñados, junto con el módulo de control, una fuente de alimentación de 12 V para el módulo de control y circuito interfaz, así como conectores de entrada y salida.

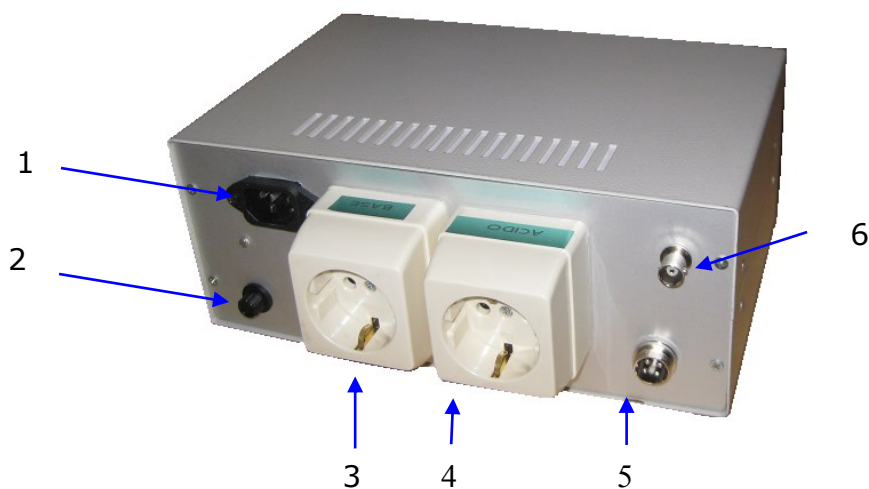


Figura 35 Panel posterior de la caja de control de pH

La Figura 35 muestra el aspecto de la cara posterior de conexiones de dicha caja. Las conexiones previstas son las siguientes:

- 1.- Alimentación de red.
- 2.- Fusible de 1 A de protección.
- 3.- Base para conectar bomba dosificadora de alcalino.
- 4.- Base para conectar bomba dosificadora de ácido.
- 5.- Conexión con bus *RS-485*.
- 6.- Conexión de sonda de pH.

5.1.4 SUBSISTEMA DE MEDIDA DE PRESIÓN

Para la medida de la presión se dispone de un sensor tipo galga, fabricado por Honeywell, modelo *26PCB*. En la hoja de características que proporciona el fabricante se indica una alimentación recomendada para dicho sensor de +10 V, un valor medio de resistencia de entrada de 7,5 k Ω y una sensibilidad de 10 mV/psi. En la Figura 36 se muestra los detalles constructivos y el esquema de conexionado eléctrico sugerido por el fabricante.

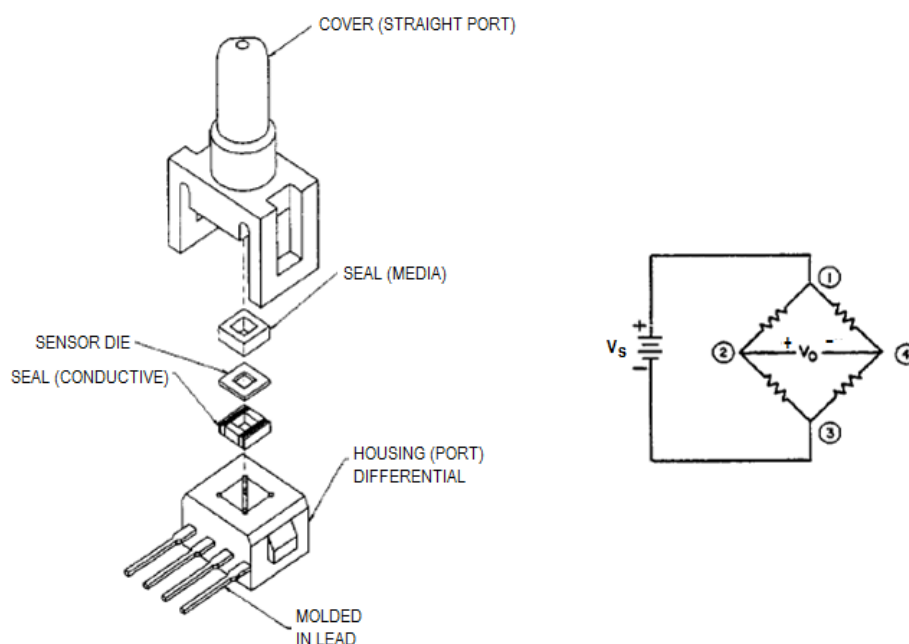


Figura 36 Sensor de presión 26PCB. Información del fabricante

Para la mayoría de los ensayos que se pretenden realizar se emplea como unidad de medida de presión el mmHg, por lo que procede expresar la resolución del sensor en esta unidad.

$$S = 10 \frac{mV}{psi} \times \frac{1 psi}{51,72 mmHg} = 193,35 \frac{\mu V}{mmHg} \quad (5)$$

Una variación de presión de 200 mmHg se corresponde con variaciones de tensión a la salida del sensor de 38,67 mV, que se convierten en variaciones de 386,7 mV conectando un amplificador de ganancia 10 a la salida del sensor. Por lo tanto, si el módulo de adquisición de datos que convierte la tensión de salida del amplificador se configura para el rango de ± 500 mV, será posible medir variaciones de presión superiores a 200 mmHg.

Hay estudios sobre motilidad intestinal (Camilleri, 1998; Haster, 2006) que informan de variaciones de presión en el intestino delgado en mamíferos superiores del orden de 50 mmHg con respecto a la presión atmosférica. Sushil K. Sarna (Sarna, 2006) reporta variaciones de presión no superiores a 100 mmHg durante las contracciones del colon. Estos datos sugieren la magnitud de los valores de variaciones de presión que se pretende manejar durante la simulación intestinal. No obstante, se ha considerado apropiado que el sistema pueda registrar valores mayores de presión para facilitar los procesos de ajuste y regulación, o ensayos en los que se necesita experimentar con variaciones de presión superiores que pueden ser requeridas por las características propias de las membranas usadas.

Con esta configuración la resolución de la medida realizada por el módulo, expresada como valor menos significativo (*LSB*) que puede distinguir, viene dada por la relación entre el fondo de escala y el número de bits de la conversión analógico-digital.

$$LSB = \frac{+500mV - (-500mV)}{2^{24}} \approx 0,06\mu V \quad (6)$$

Teniendo en cuenta que la variación de tensión de salida del sensor para una variación de presión de 1 mmHg es el valor indicado en la expresión (5), y que dicha tensión a su vez es amplificada, el resultado de la expresión (6) valida que el sistema es capaz de detectar y medir variaciones de presión por encima de 200 mmHg, con resolución inferior a 1 mmHg.

En la Figura 37 se muestra la conexión del sensor de presión a un circuito amplificador de instrumentación *INA110* comercializado por la corporación Texas Instruments-Burr Brown. El sensor se ha simbolizado por un puente de resistencias. La salida V_{OUT} se conecta a un canal de entrada analógica del módulo de adquisición de datos usado para la medida de presión. La ganancia del amplificador *INA110* se configura fácilmente, tal como se indica en la citada figura, conectando la patilla 3 con una de las patillas disponibles para tal fin. Este dispositivo permite ajustar además el *offset* de entrada, con lo que se pueden adaptar las variaciones de tensión producidas por las variaciones de presión al rango de entrada de la etapa de conversión de datos, según convenga.

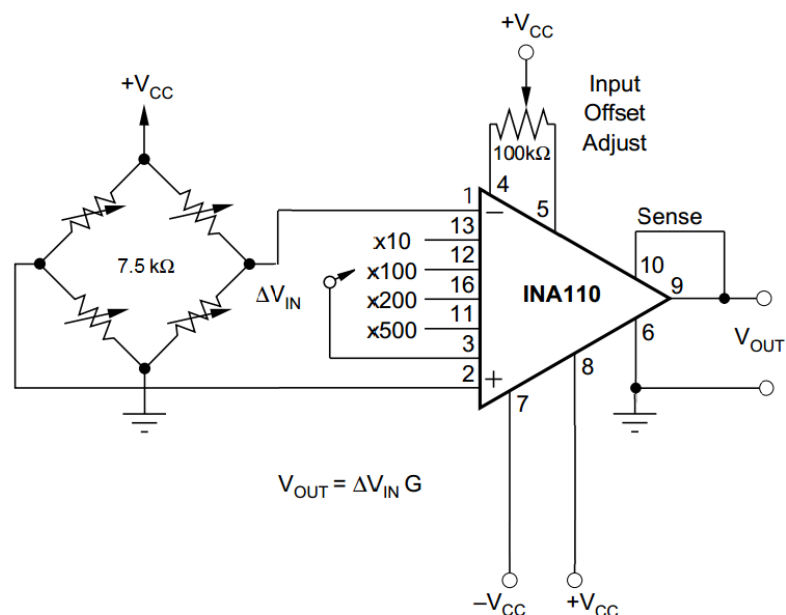


Figura 37 Circuito acondicionador de señal de sensor de presión

En definitiva se ha diseñado un subsistema configurable y de uso flexible.

En la Figura 38 se muestran los componentes usados para conseguir la tensión de alimentación necesaria para polarizar el circuito anterior. Se han elegido reguladores de tensión cortocircuitables de las familias *LM78XX* y *LM79XX* y se han dispuesto según notas de aplicación del fabricante.

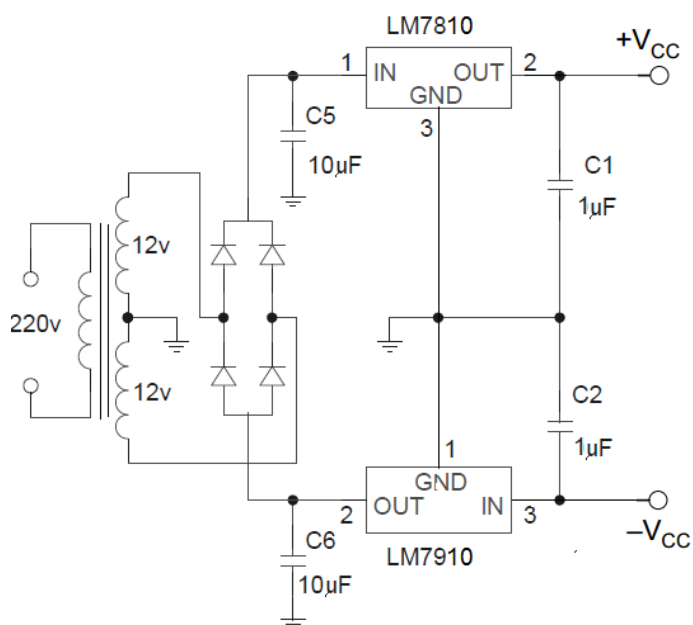


Figura 38 Fuente de alimentación para circuito sensor de presión



En una caja (Figura 40) se han alojado los módulos de interfaz, el módulo de adquisición de datos, la fuente de alimentación del módulo y la fuente de

alimentación del circuito amplificador. Junto con estos elementos, se incluyen un conjunto de conectores, toma de tensión de red, interruptor general de encendido, etc.

El medidor de presión que incorpora el módulo de filtración requiere de una alimentación de 24 V. Se emplea una misma fuente conmutada para este dispositivo y para los módulos ICP-CON.

Los módulos ICP-CON se alimentan con tensión continua comprendida entre 10 y 30 voltios, por tanto es válida la fuente de 24 V. El consumo de los módulos es de 150 mA, aproximadamente, y medidor de presión que incorpora el módulo tubular consume 60 mA. Se ha escogido una fuente de alimentación conmutada comercial de 24 V y hasta 1 A de salida, de tamaño reducido y cortocircuitable, insertada en la placa base. También se ha dispuesto un conector especial para para alimentar el sensor de presión acoplado al módulo de filtración.

Por su parte, el circuito amplificador *INA110* consume menos de 5 mA y el sensor se alimenta a 10 V y tiene una resistencia media de 7,5 k Ω por tanto su consumo es de 1,3 mA. Los circuitos reguladores de tensión usados (Figura 38) admiten un consumo de hasta 1 A, por lo que son más que válidos para este diseño. Puesto que la toma de -10 V apenas tiene consumo, sólo se ha considerado necesario disponer de disipador de calor en el regulador de tensión positiva, *LM7810*.

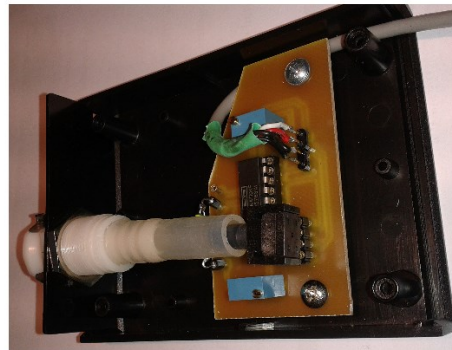


Figura 41 Caja de sensor de presión y amplificador

El montaje físico del esquema mostrado en la Figura 37 implica resolver la confluencia en un entorno muy próximo de circuitos eléctricos y el circuito hidráulico terminado en el elemento sensor. Se ha optado por insertar el sensor de presión y el amplificador de instrumentación en una caja exterior, según se muestra en la Figura 41, con el objeto de aislar y proteger la caja que contiene los interfaces y conexiones de alimentación ante posibles riesgos de fugas, pérdidas o derrames de líquidos.

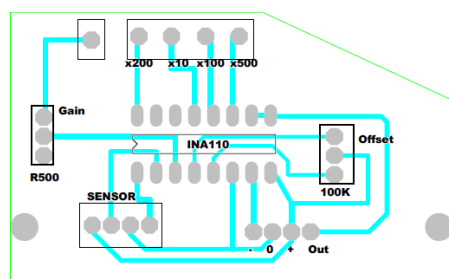


Figura 42 Placa de sensor de presión

El montaje comprende (Figura 41 derecha), además de la caja, una placa de circuito impreso donde se realizan conexiones e insertan el amplificador y el sensor (ambos sobre zócalo, para facilitar su reemplazo) y potenciómetros de ajuste de *offset* y ganancia.

La Figura 42 muestra, a tamaño natural aproximado, la distribución de componentes y trazado de las pistas.

Mediante un tubo semiflexible de silicona se conecta el sensor de presión a un conector hidráulico de acoplo rápido para montaje en panel, preparado para el acoplamiento de elementos de encastre (Figura 41 izquierda) vinculados al circuito hidráulico. Por supuesto, es fundamental asegurarse del perfecto sellado de la conexión del tubo flexible con el sensor y con cuerpo de acoplamiento, para evitar fugas de líquidos, empleando abrazaderas si es preciso.

La Figura 43 muestra las conexiones realizadas, disposición de elementos y trazado de pistas de la placa base usada.

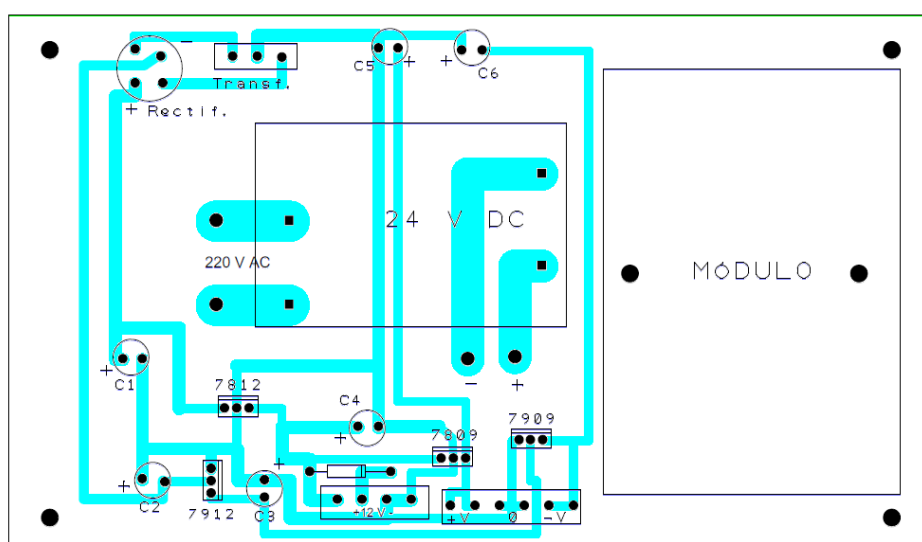


Figura 43 Placa base de interfaces y medida de presión

En la Figura 44 se indican las conexiones realizadas en los paneles delantero, trasero y lateral de comunicaciones. En la Figura 45 se muestra la disposición de elementos del panel lateral de alimentación.

- 1.- Sensores de presión. El sistema está preparado para dos sensores de presión, conectados al canal 3 y canal 5 del módulo *i-7017*.
- 2.- Salida auxiliar de +24 V (para medidor de presión *Endress*).
- 3.- Conector *BNC* para entrada analógica auxiliar, conectado al canal analógico 1.
- 4.- Conexión auxiliar de bus *RS485* más línea de alimentación de +24 V.
- 5.- Conexión a *Biostat* (bus *RS422*).

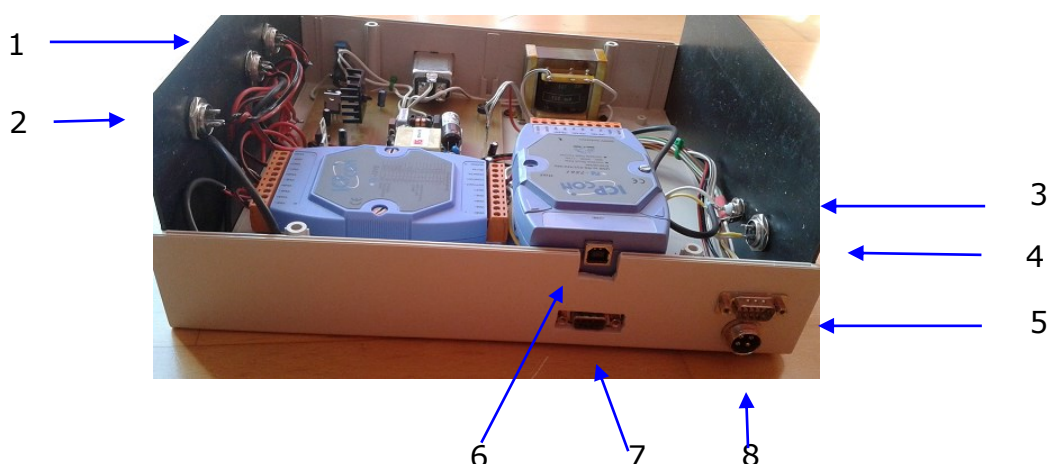


Figura 44 Conexiones de la caja de interfaces y medida de presión

- 6.- Conexión al puerto serie del ordenador del interfaz *RS-232* a *RS-422* (sustituye al interfaz *USB* descrito en la documentación).
- 7.- Conexión *USB* a ordenador del interfaz al bus *RS485*.
- 8.- Conexión del bus *485* con el subsistema de control de pH.

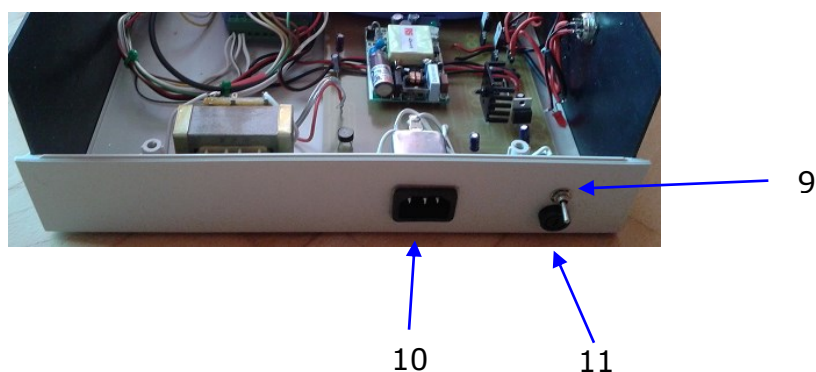


Figura 45 Panel lateral de alimentación de la caja de interfaces y medida de presión

9.- Interruptor general.

10.- Toma de tensión de red de 230 V_{AC}.

11.- Fusible de protección (casquillo de 20 mm, 1 A).

5.1.5 CONEXIONES DEL ELEMENTO DE FILTRACIÓN

Como ya se ha comentado, para simular los procesos de absorción intestinal se emplea un módulo tubular de membranas que se complementa con el reactor de tanque agitado, en el que se ajustan los parámetros físico-químicos de los productos objetos de investigación. Para la aportación a este módulo de material procedente del tanque agitado se configura un circuito hidráulico activado por una bomba peristáltica. En adelante se emplearán los términos de *dilución* o de *impulsión* para referirse a este circuito hidráulico así como al sistema de propulsión implicado.

Una segunda bomba peristáltica regula el circuito por el que se produce el retorno del producto no filtrado al tanque agitado. En adelante se empleará el término de *retorno* para hacer referencia al así como al circuito hidráulico implicado, así como al sistema de propulsión empleado.

Se emplean tubos flexibles de silicona, válidos para su uso con bombas peristálticas, para implementar las conexiones hidráulicas y en los casos que se precisa, se emplean acoplamientos rápidos, de un cuarto de pulgada, de la serie *PLC* distribuidos por el fabricante *Colder Products*.



Figura 46 Reactor tubular. Entrada de impulsión y salida de filtrado

La Figura 46 muestra el detalle de la conexión al reactor del conducto procedente de la bomba de impulsión. También se aprecia la salida de producto filtrado. El uso de racores de acoplamiento rápido, además de facilitar las conexiones, permite tareas de limpieza de los elementos después de realizar los ensayos y aporta versatilidad al sistema.



Figura 47 Reactor tubular. Detalle de la conexión de retorno

En el extremo opuesto del tubo se realiza la conexión con el circuito de retorno. Se ha adoptado una conexión tipo “T” en la salida del módulo tubular, tal como se aprecia en la Figura 47. A dicha conexión se ha acoplado una llave de paso que da acceso a un circuito de desagüe, útil para tareas de enjuague y limpieza. En condiciones de uso normal hay que asegurarse que dicha llave de paso se encuentra cerrada. En el otro lado se encuentra un acoplo rápido.

5.1.6 CONTROL DE CAUDAL

En un circuito hidráulico las variaciones de caudal se pueden obtener variando la velocidad de los mecanismos rotatorios de impulsión empleadas, sin embargo, en este trabajo de investigación se ha optado por regular los caudales de las bombas variando el ciclo de trabajo de bombas peristálticas que funcionan con movimiento de rotación constante.

El uso de bombas peristálticas, como ya se ha comentado, facilita el transporte de alimentos y reactivos sin que se produzca contacto físico entre los productos y los elementos de impulsión, evitándose así su contaminación.

El control “todo-nada” de un dispositivo rotatorio es mucho más fácil de implementar que un control lineal basado en variar la velocidad de giro.

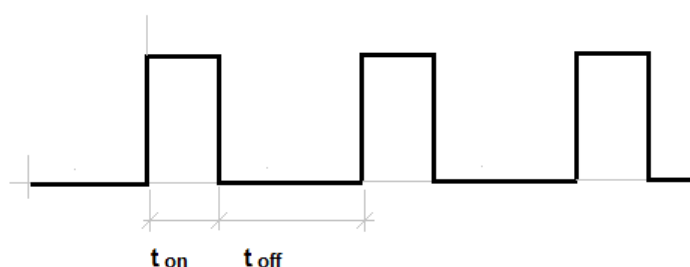


Figura 48 Ciclo de trabajo de funcionamiento de una bomba

La Figura 48 muestra un modo de funcionamiento de una bomba. Durante un tiempo t_{on} la bomba está funcionando; le sigue un intervalo de tiempo t_{off} durante el cual la bomba está inactiva. Estos intervalos se repiten de forma consecutiva. Se denomina *ciclo de trabajo*, D , expresado como porcentaje, a la relación:

$$D(\%) = \frac{t_{ON}}{t_{ON} + t_{OFF}} \times 100 \quad (7)$$

Mediante ensayos previos de calibración se puede determinar el caudal máximo que mueve cada una de las bombas empleadas y que se correspondería con un ciclo de trabajo del 100%. Para un ciclo de trabajo Di , el caudal que mueve cada bomba es:

$$caudal = \frac{caudal_{MAX} \times Di}{100} \quad (8)$$

Se desprende que resulta fácil controlar el caudal que mueve cada dispositivo de impulsión variando la relación entre tiempo de activación y tiempo inactivo.

Es fundamental definir procedimientos adecuados de calibración para cada una de las bombas empleadas durante los procesos de simulación.

Queda por último comentar que el sistema *Biostat* dispone de cuatro dispositivos peristálticos, de los cuales en dos de ellos, denominados genéricamente *S1* y *S2*, se programa el caudal mediante un comando que configura directamente el ciclo de trabajo. Para el resto de bombas empleadas en esta Tesis, el caudal se programa calculando por software los tiempos de apertura y cierre.

5.1.7 CONTROL DE PRESIÓN

La Figura 49 muestra de forma esquemática las conexiones entre la bomba de impulsión y la entrada del reactor de membrana, y la salida del reactor y la bomba de retorno.

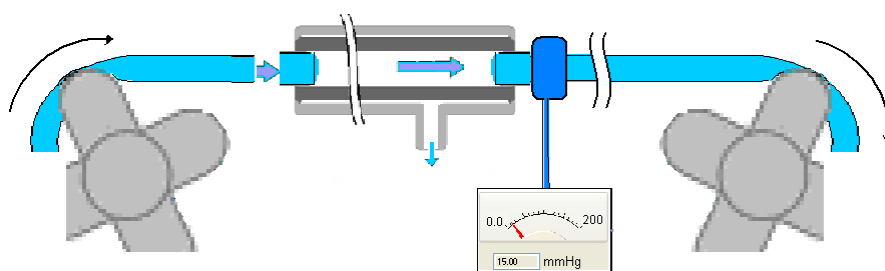


Figura 49 Esquema general de conexiones de bombas de impulsión y retorno

Se aprecia en dicha figura la inserción de un dispositivo de medida de presión en el circuito de retorno.

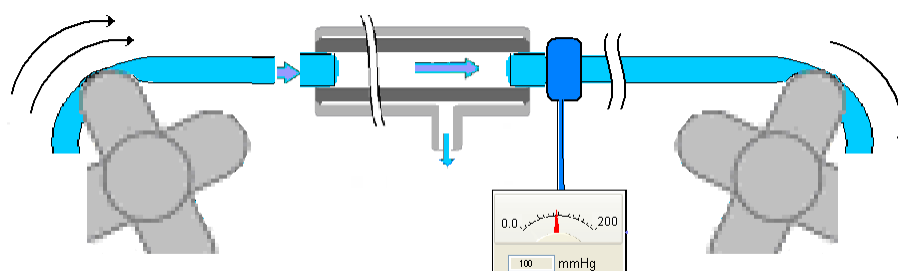


Figura 50 Esquema de conexiones de bombas de impulsión y retorno. Caudal de impulsión alto

Cuando las velocidades medias de giro de ambas bombas son similares, existe un cierto caudal de salida similar al caudal de entrada. La diferencia entre ambos caudales influye en la cantidad de producto filtrado, que resulta muy pequeña. La presión relativa medida a la salida de la bomba es muy baja. Si el caudal de entrada (aplicado por la bomba de impulsión) aumenta con respecto al caudal de retorno, tal como se intenta reflejar en la Figura 50, se incrementa la presión en el reactor y se obtiene más cantidad de producto filtrado por unidad de tiempo.

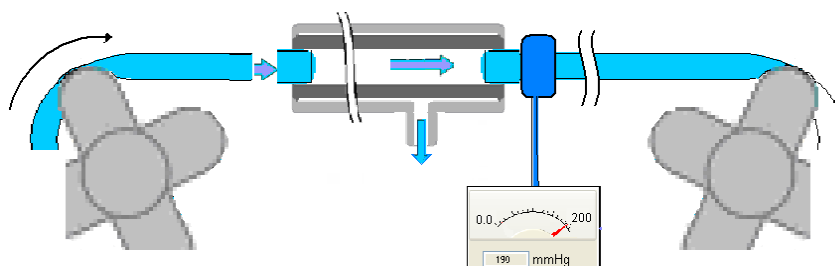


Figura 51 Esquema de conexiones de bombas de impulsión y retorno. Oclusión en retorno

Las bombas peristálticas cuando están detenidas obstruyen el paso de producto a través del conducto, como es el caso de la bomba de retorno mostrada en la parte derecha de la Figura 51. La bomba de impulsión sigue introduciendo caudal en el reactor, incrementándose considerablemente la presión en el mismo y aumentando en igual medida la cantidad de producto filtrado.

En definitiva, se puede implementar un algoritmo de control de presión basado en la actuación sobre bombas peristálticas rotatorias, que impulsan producto a través del circuito hidráulico cuando son activadas o que obturan el paso cuando no están en funcionamiento.

De este modo, la correcta actuación sobre el ciclo de funcionamiento de cada bomba consigue, además de una regulación de caudales, un control de la presión y por consiguiente, del nivel de absorción.

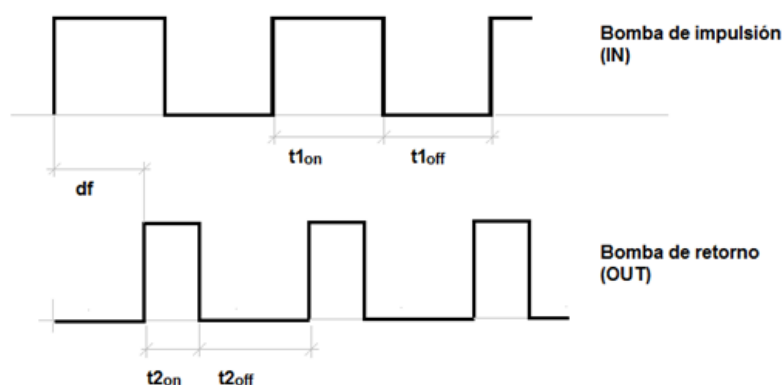


Figura 52 Ciclo de trabajo de bombas de impulsión y de retorno

La Figura 52 muestra la forma de actuar sobre las bombas. El ciclo de trabajo $D1$ de la bomba de impulsión viene determinado por la expresión:

$$D1(\%) = \frac{t1_{ON}}{t1_{ON} + t1_{OFF}} \times 100 \quad (9)$$

El ciclo de trabajo $D2$ de la bomba de retorno viene determinado por la expresión:

$$D2(\%) = \frac{t2_{ON}}{t2_{ON} + t2_{OFF}} \times 100 \quad (10)$$

La presión media en el interior del reactor tubular guarda relación de proporcionalidad con la diferencia $D1-D2$. A su vez, la cantidad de producto filtrado por unidad de tiempo guarda también relación proporcional con la presión media en el reactor.

Resulta muy conveniente establecer un límite de presión en el reactor, de forma que cuando el sensor de presión genere valores superiores al máximo establecido, el software de control active la bomba de retorno y detenga momentáneamente la bomba de impulsión, a fin de no sobrepasar los valores establecidos.

Se han realizado experimentos empleando dos sensores de presión. Uno insertado en el circuito de retorno, tal como se ha descrito, y otro acoplado al circuito de dilución. Se ha constatado que éste segundo sensor no aporta información relevante. La información útil en las aplicaciones desarrolladas es aportada por el sensor de presión colocado cerca de la bomba que provoca la oclusión temporal del circuito de retorno. El uso del sensor que mide la presión en el circuito de impulsión es opcional y permite a los programas de control identificar posibles averías o comportamientos anómalos,

5.1.8 DESARROLLO SOFTWARE

En lugar de elaborar una única aplicación, se ha optado por diseñar un conjunto de funciones o subprogramas, de forma que puedan integrarse en distintas aplicaciones adaptadas a las necesidades de los usuarios en un momento dado. Hay una serie de funciones que se ejecutan en paralelo, usando diferentes hilos de programación y un conjunto de variables globales, agrupadas en subconjuntos o *arrays*. Se ha hecho uso de las facilidades proporcionadas por *CVI* para la programación multitarea, pudiendo asignar diferentes hilos de ejecución para determinadas funciones, tales como guardar o escribir datos en fichero, acceso a distintos puertos de comunicaciones, operaciones de cálculo, etc.

Se han empleado librerías *ActiveX* para operar con ficheros *Excel*. Se usan controles para Microsoft *Excel 97*. De este modo se consigue compatibilidad entre todos los posibles equipos en los que es susceptible de usar los programas desarrollados. El uso que se hace de estas librerías es crear, abrir y cerrar ficheros *Excel* e importar o exportar datos de una hoja de cálculo a una tabla de datos (elemento de un panel *CVI*).

5.1.8.1 Versión de *CVI* y sistema operativo

Las aplicaciones expuestas en esta Tesis Doctoral han sido desarrolladas en parte en el ordenador personal para uso doméstico del autor, usando versiones de prueba, y en ordenadores del Departamento de Tecnología Electrónica, cada uno con una versión distinta de *CVI*, dependiendo de la licencia disponible en el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga en el momento de la instalación. A su vez, estas aplicaciones se ejecutan en un ordenador ubicado en el laboratorio adscrito al grupo de investigación (Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad de Granada), de bajas prestaciones con sistema operativo *Windows XP*.

En resumidas cuentas, a la hora de programar se ha tenido en cuenta que las aplicaciones desarrolladas se ejecuten correctamente tanto en *Windows XP* como en *Windows 7*, y puedan ser depuradas con cualquier versión de *CVI* comprendida entre la versión 9 (otoño de 2008) y la versión de finales de 2013 (el autor no dispone de versión posterior, a fecha de redacción de este apartado). Esto se consigue prestando especial interés a la hora de guardar los ficheros de interfaz de usuario (extensión “*.uir”) y hacerlo siempre para versión 9, por ser ésta la versión más “antigua” usada.

5.1.9 FICHERO DE CONFIGURACIÓN

Se ha definido un fichero de configuración en el que se almacenan una serie de parámetros configurables que afectan a los diversos periféricos usados: dirección

de puertos serie, configuración de módulos de adquisición de datos, coeficientes para conversión de valores, y otros parámetros considerados de interés.

1	c:/programas/reactor
2	dirPRESION 3
3	dirModulo 5
4	rango pH 4
5	rango PRESION 5
6	puertoB 3
7	puertoI 1
8	Baudios 9
9	porcentajeDil 75
10	porcentajeRet 50
11	T ^a 36.6
12	Diluir
13	Retorno
14	Reactivo A
15	Reactivo B
16	Coef_pH 9.266684
17	Cero pH 5.493596
18	Coef. ACIDO 0.152
19	Coef. acido 0.1375
20	Coef. BASE pH 0.44
21	Coef. base pH 0.6
22	BombaUNO 1.6
23	BombaDOS 0.712
24	BombaTRES 0.6
25	BombaCUATRO 1.319
26	Bomba_uno 1.689
27	Bomba_dost 0.81
28	Bomba_tres 0.3
29	Bomba_cuatro 1.42
30	ceroPresionIN 276.532547
31	coefPresionIN -150.649677
32	CanalSensorIN 5
33	CanalSensorOUT 2
34	ceroPresionIN 276.532547
35	coefPresionIN -150.649677
36	puertoBalanza 4
37	baudiosBioStat 7
38	canalAuxpH -1

Tabla 3 Campos del fichero de configuración

Se usan librerías *ActiveX* que permiten manipular ficheros *Excel-98* o versiones posteriores, a fin de lograr la máxima compatibilidad de las aplicaciones desarrolladas. Estas funciones utilizan como elemento auxiliar una tabla definida en el panel de interfaz de usuario (no tiene por qué estar visible) que a

su vez cumple con la misión de proporcionar valores por defecto si se desea prescindir del uso de ficheros externos. Los campos que conforman dicha tabla coinciden con los campos contenidos obligatoriamente en el fichero de configuración (Tabla 3).

El primer campo contiene el directorio de trabajo. Si este campo está en blanco, se usa por defecto el directorio donde se ubica el programa ejecutable.

Los campos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 36 y 37 contienen información acerca de los puertos serie empleados, velocidad de transferencia y direcciones *485* de los módulos.

Los campos 9 y 10 establecen valores iniciales del ciclo de trabajo de las bombas de impulsión y retorno.

Los campos 11 al 15 contienen los nombres con los que se muestran en pantalla los reactivos asociados a los elementos de dosificación del sistema *Biostat*.

Con los coeficientes indicados en los campos 16 y 17 se define la recta de carga de la medida de pH.

Los campos 18 a 29 contienen los coeficientes aplicados a las bombas dosificadoras. Se han establecido coeficientes distintos para ciclos largos (identificados con mayúsculas) y para ciclos cortos (identificados con minúsculas).

Los campos 30 al 35 contienen los coeficientes de calibración de los sensores (el sistema contempla la posibilidad de usar dos elementos de medida) así como el canal de entrada asignado en el módulo de adquisición de datos.

Por último, se reserva el campo 38 en previsión de usar un tercer canal analógico de entrada del módulo de adquisición de datos, que puede ser usado para leer presiones, para realizar una medida de pH, o alguna otra necesidad que surja.

Las aplicaciones desarrolladas interpretan la información de cada tabla separando el contenido en caracteres alfabéticos y cifras. Los caracteres alfabéticos son desechados mientras que con las cifras se conforma una variable numérica de tipo entero.

5.1.10 FICHERO DE DATOS

En un fichero de texto se guarda en tiempo real medidas e información relativa a los procesos de simulación que se realizan. Para no saturar el sistema se guardan los datos en grupos.

Los programas realizados incluyen funciones para generar ficheros de texto, con extensión “*.txt” conformados por un conjunto de campos, separados por símbolos de “punto y coma”. Este tipo de ficheros es fácil de interpretar por multitud de aplicaciones, tales como *Excel*, *Derive*, *Matlab*, etc.

La aplicación que implementa esta funcionalidad debe contar en alguno de los paneles que conformen la interfaz de usuario un control tipo “tabla”, que no tiene necesariamente por qué estar visible. Este control contiene filas con 17 columnas

y en cada columna se guarda un parámetro. Hay tantas filas como medidas consecutivas se realizan de los parámetros registrados.

La Tabla 4 refleja el contenido de las columnas, que se corresponde con la distribución de datos en cada línea del fichero creado. También se indica el tipo de dato asociado a cada parámetro.

La unidad de volumen empleada es el mililitro. Para el resto de parámetros se indica la unidad en el campo de *contenido*.

COLUMNA	CONTENIDO	TIPO
	Número de orden (solo en fichero *.txt)	natural
1	Tiempo (segundos) desde el origen	entero
2	Volumen de ácido	entero
3	Volumen dosificado por S1	entero
4	Volumen dosificado por S2	entero
5	Volumen dosificado por S3	entero
6	Volumen dosificado por S4	entero
7	Volumen de base	entero
8	Volumen de “otro” (introducido manualmente)	entero
9	- reservado -	-
10	Valor de pH	entero
11	Valor de T ^a (°C)	entero
12	Valor del agitador (rpm)	entero
13	Actuación de bombas	natural
14	Peso (gramos)	entero
15	Presión 1 (mmHg)	entero
16	Presión 2 (mmHg)	entero
17	Evento	Texto

Tabla 4 Registro de datos

La Figura 53 muestra el flujograma que describe la operatoria seguida por las funciones relacionadas con la creación y manejo del fichero de datos.

Salvaguardar datos con mucha frecuencia conlleva muchas operaciones de acceso a disco y una atención de recursos por parte del ordenador que puede redundar en ralentizar otras tareas, como por ejemplo operaciones de medidas. Por el contrario, si se espera a tener mucha cantidad de datos, se pueden superar los tamaños de caché rápida, ralentizándose la escritura. Además, se corre el riesgo de pérdida de datos en caso de salidas accidentales o algún tipo de incidencia que rompa la normal ejecución del programa.

Se ha comprobado que el proceso de escritura en disco se realiza de forma óptima si se trasladan los datos al fichero de 20 en 20 filas.

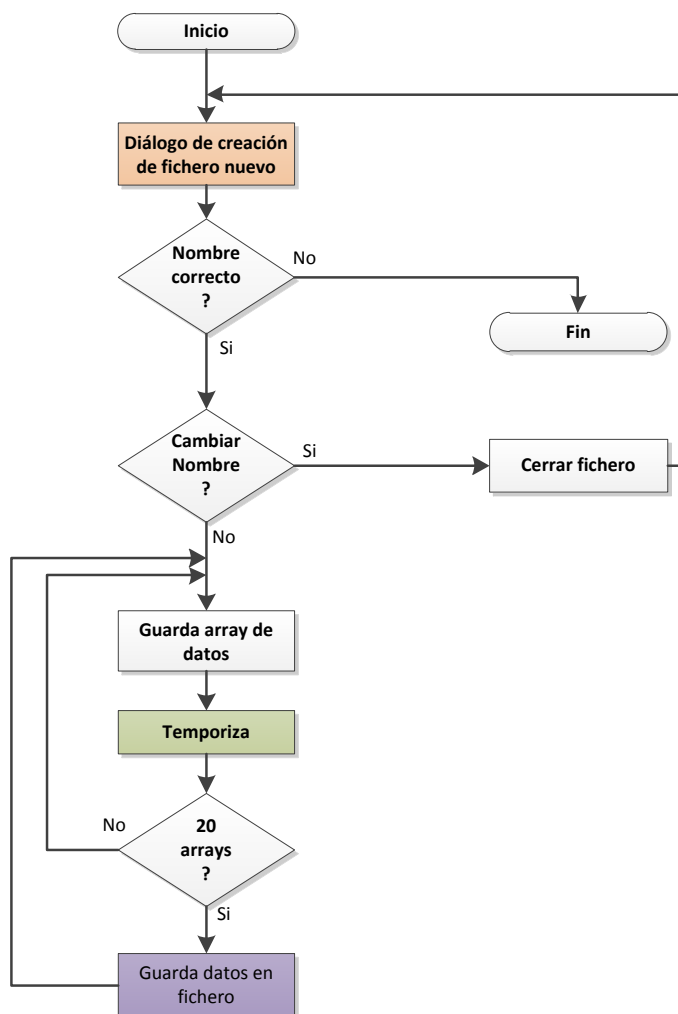


Figura 53 Algoritmo de creación y manejo de fichero de datos

5.1.11 MEDIR Y REGISTRAR VALOR DE pH

El control y regulación del nivel de pH se ha resuelto mediante la acción simultánea de dos procesos que se ejecutan simultáneamente. El sistema de adquisición de datos actualiza en modo continuo la medida de pH, promediando en tiempo real las lecturas obtenidas del electrodo empleado. Por otro lado, las funciones relacionadas con la dosificación de ácido o base emplean este valor de pH actualizado como parámetro de entrada, en las tomas de decisión que conllevan activar o desactivar el correspondiente dispositivo dosificador, como se verá más adelante.

La Figura 54 muestra el flujograma que describe el proceso de medir pH y registrar el valor obtenido.

La acción “Lee canal analógico” conlleva un intercambio de comandos y mensajes con el módulo de adquisición de datos que concluye con obtención de un valor numérico que se corresponde con una medida en mV. Para convertir este dato, una vez promediado, en valor de pH, se aplican dos coeficientes calculados previamente durante un proceso de calibración.

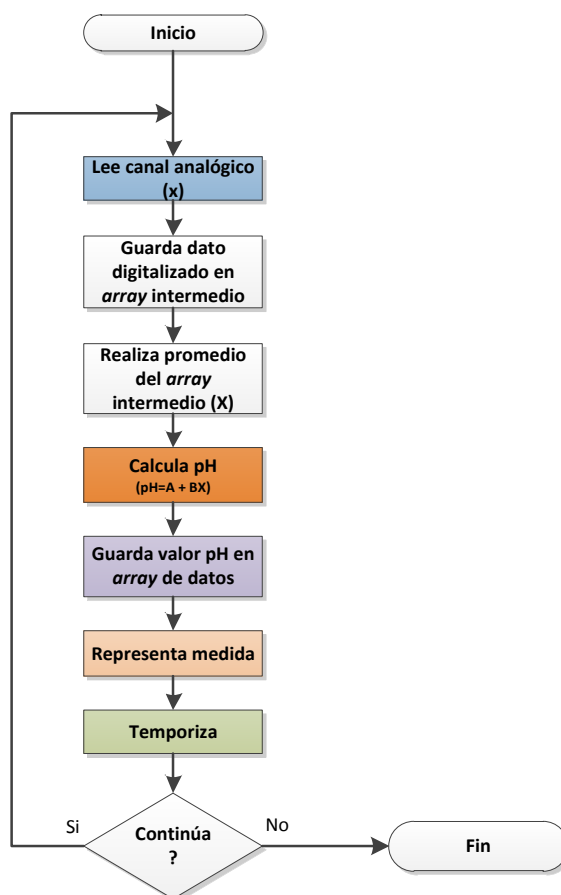


Figura 54 Algoritmo de medir y registrar valor de pH

5.1.12 REGULAR pH DOSIFICANDO ÁCIDO O BASE

De modo genérico, el proceso de regulación de pH durante la simulación de estómago o de duodeno se define porque partiendo de un estado inicial, definido por el par de valores pH_0 y t_0 , se quiere llegar a un estado final, en el instante t_{Final} y caracterizado por un valor pH_{Final} (Figura 55a).

Activando la correspondiente bomba (de ácido o de base) durante un intervalo de tiempo δt se produce una variación de pH que se va a denominar ΔpH .

$$\delta t = t - t_0 \quad (11)$$

$$\Delta pH = pH - pH_0 \quad (12)$$

ΔpH es función del volumen (mL) de reactivo añadido, que a su vez es proporcional al intervalo de tiempo δt durante el cual se acciona la bomba.

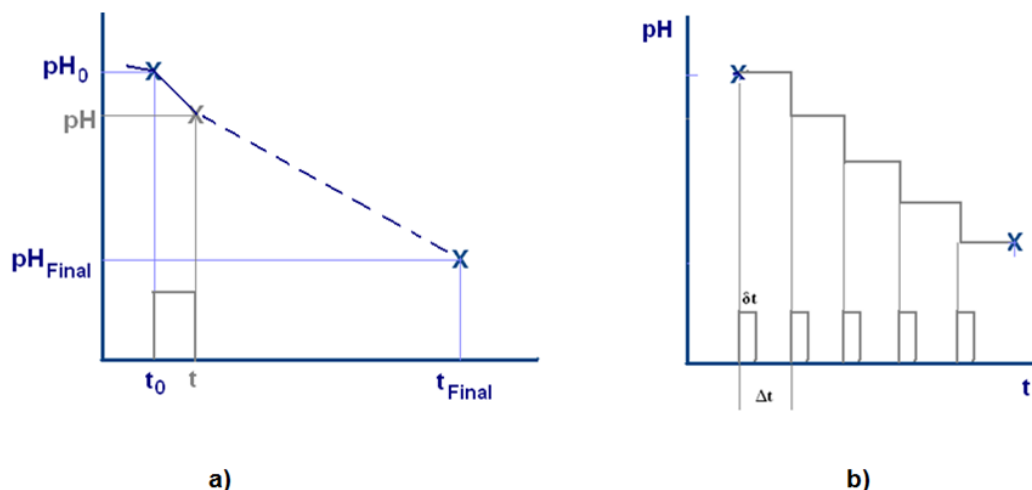


Figura 55 Diagramas de tiempo de regulación de pH

El objetivo final es alcanzar el valor final de pH después de N intervalos, que duran un tiempo ΔT , durante los cuales se producen variaciones de pH como consecuencia de la acción de la bomba durante los intervalos de duración δt (Figura 55b).

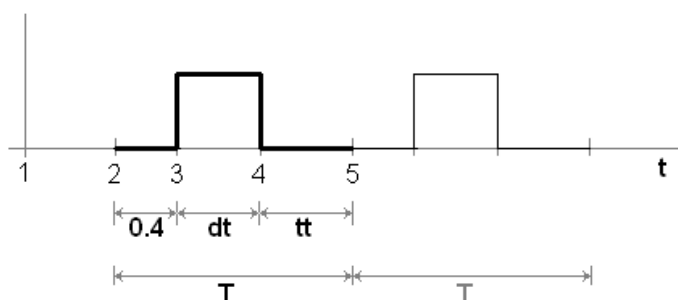


Figura 56 Ciclo de trabajo de bomba dosificadora de ácido o base

Cuando el usuario introduce a través de un panel de interfaz un valor final de pH y el caudal de dosificación deseado el programa debe calcular el ciclo de trabajo del sistema de dosificación que permite dosificar el caudal seleccionado (Figura 56) partiendo del caudal máximo que puede proporcionar dicha bomba, que es un dato conocido por estar registrado en el fichero de configuración.

La Figura 57 muestra el algoritmo usado para poder deducir los intervalos de las funciones de temporización usadas por el algoritmo de regulación, cuyo flujograma se muestra en la Figura 58.

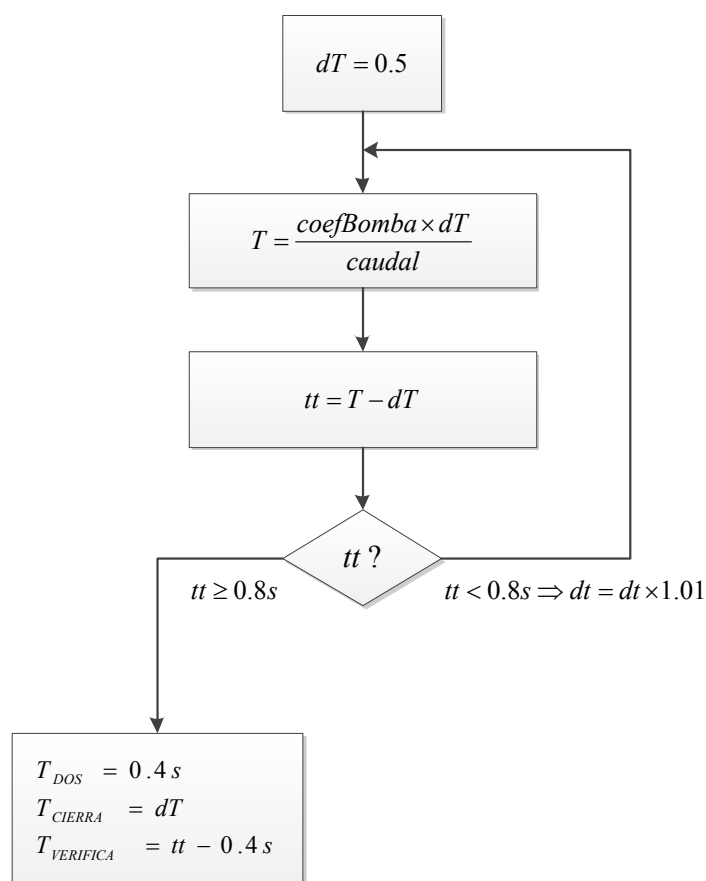


Figura 57 Cálculo del ciclo de trabajo de la bomba de ácido o base

El intervalo de 0,4 segundos es fijo por ciclo. Se emplea este tiempo para hacer ajustes y comprobaciones, además de permitir cumplir con los tiempos mínimos de activación y parada de las bombas dosificadoras de reactivos.

El cálculo de estos coeficientes conlleva además algunos ajustes y comprobaciones adicionales.

- Se verifica que el nivel de segregación no supere un valor máximo, determinado por el caudal de la bomba funcionando a un 95%.
- Se establece un dT mínimo (intervalo de tiempo durante el cual se activa la bomba).
- Se calcula el intervalo tt , durante el cual la bomba está inactiva.
- Si se obtiene un valor de tt muy pequeño, se incrementa dT y se repite el cálculo. Esto conlleva variar la frecuencia para mantener el ciclo de trabajo.

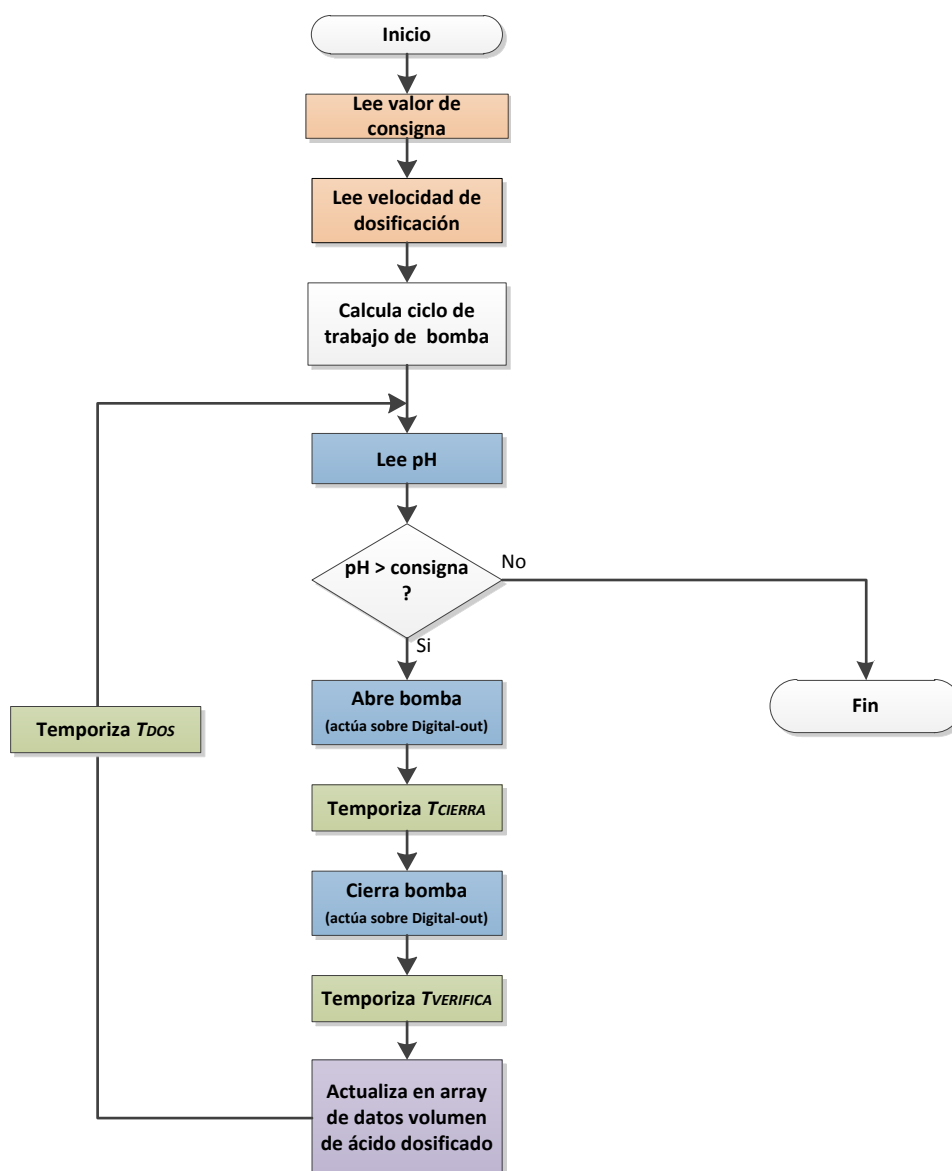


Figura 58 Algoritmo de regulación de pH dosificando ácido o base

El proceso finaliza cuando la diferencia (en valor absoluto) entre el pH medido y el valor de consigna (pH final) disminuye por debajo de un determinado valor umbral. Durante esta etapa se comprueba también que la variación de pH sufrida con respecto al último ciclo. Si la variación de pH es inferior a 0,01 se genera el mensaje “pH no varía”, alertando al usuario sobre alguna posible anomalía en el suministro de ácido o base.

REGULACIÓN DE pH DURANTE LA SIMULACIÓN DEL INTESTINO DELGADO.

El objetivo de esta regulación es que el pH no baje de un valor consignado. Cada cierto tiempo se comprueba el valor de pH. Si este valor es inferior

al valor consignado, con un cierto margen de tolerancia, se acciona durante un corto espacio de tiempo la bomba que dosifica reactivo alcalino.

Este proceso se realiza indefinidamente mientras dure el subproceso de simulación del intestino delgado.

5.1.13 MEDIR Y REGISTRAR VALOR DE PRESIÓN

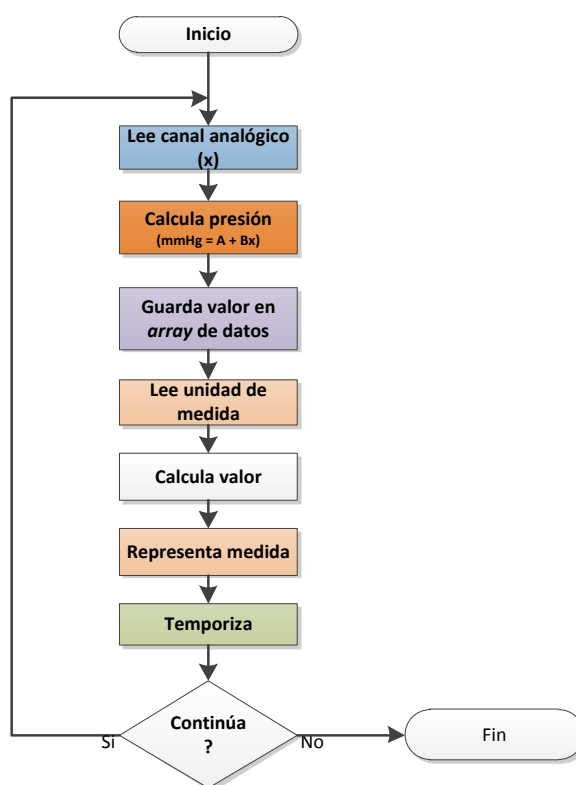


Figura 59 Algoritmo de medir valor de presión

Realizar una medida de peso no es diferente de realizar una medida de pH (Figura 59). De hecho, en la mayoría de aplicaciones desarrolladas, las líneas de programación encargadas de la lectura de presión se insertan en las mismas rutinas de lectura de pH. En definitiva se trata de leer un canal analógico de un módulo, extraer la información numérica de la cadena de datos obtenida, promediar si procede y aplicar unos coeficientes para convertir un valor de tensión, normalmente mV, en un valor de presión. Por defecto se mide en mmHg. A diferencia de las medidas de pH, los valores de presión obtenidos son representados y guardados en el fichero directamente. El promediado de estos valores, si procede, se realiza a posteriori para facilitar la comprensión de la representación gráfica de los mismos.

Se han realizado pruebas usando varios métodos para regular presión. A continuación se describe el método simple adoptado con el que se han obtenido resultados aceptables. En el Anexo III se describen otros métodos de regulación opcionales.

El método para regular presión empleado consiste básicamente en asignar a la bomba de impulsión un caudal superior al de la bomba de retorno. Una función temporizada compara periódicamente el valor obtenido de la medida de presión con un valor de consigna prefijado y en base al resultado abre o cierra la bomba de impulsión. Si el resultado es positivo detiene la bomba. Como la bomba de retorno sigue funcionando, disminuye la presión. Si la presión en cambio es inferior al valor de consigna, activa el funcionamiento de la bomba, aumentando la presión. Para que sea efectivo este control es importante recordar que el caudal de la bomba de impulsión debe ser superior al de la bomba de retorno.

5.1.14 DOSIFICAR OTROS REACTIVOS

Por regla general, las velocidades de dosificación de los reactivos van a ser inferiores a la velocidad de la bomba asociada. Es por ello que se contempla el control del dispositivo de regulación variando su ciclo de trabajo, tal como se muestra en el flujograma de la Figura 60.

Para llevar a cabo el proceso se necesita conocer dos parámetros: el volumen a dosificar y la velocidad de dosificación. Se usa a veces el término segregación si se está simulando el comportamiento de una glándula, por ejemplo.

El volumen a dosificar se puede introducir directamente, aunque en bastantes experimentos es usual que se calcule como un porcentaje del volumen del reactor. A su vez, el reactivo se aplica diluido. Es por ello que se incluyen controles adicionales que actualizan el volumen del reactor y que facilitan el cálculo del volumen a segregar en base a los datos introducidos en pantalla.

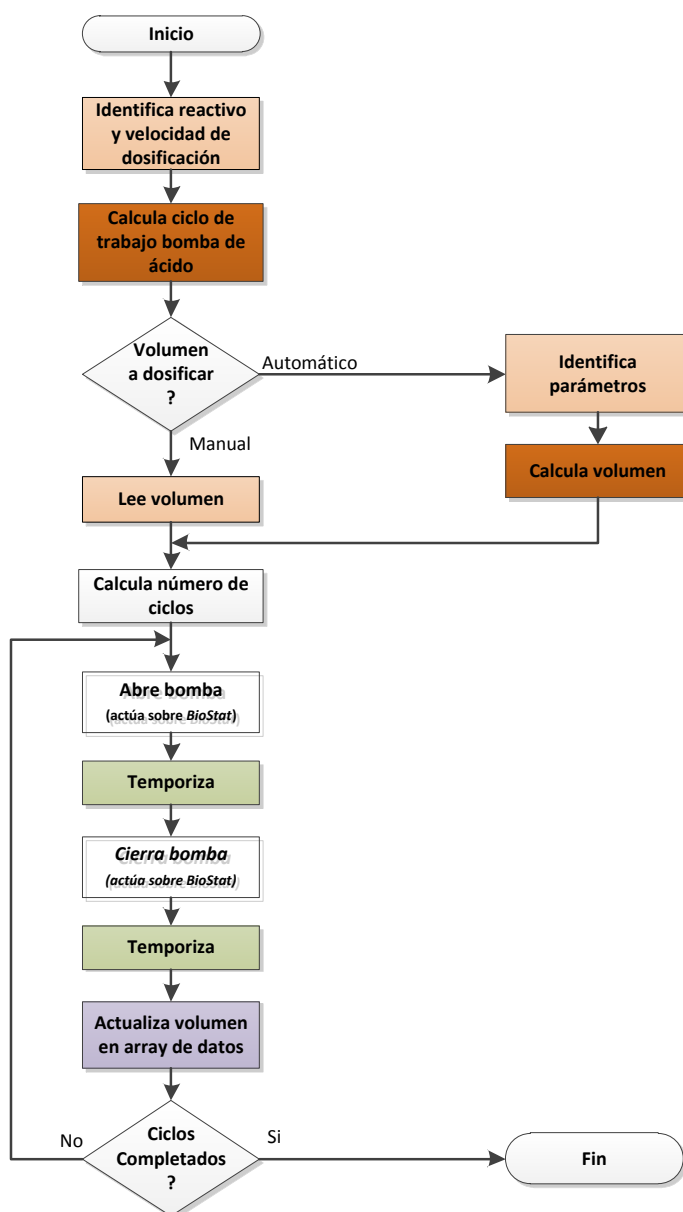


Figura 60 Algoritmo de dosificación de reactivos

5.1.15 MEDIR Y REGISTRAR VALOR DE PESO

El flujograma de la Figura 61 muestra el algoritmo empleado para medir y registrar valores de peso.

Dicho algoritmo se inicia con la identificación del puerto serie asociado a la conexión *USB* que comunica la balanza de precisión con el ordenador. El proceso de comprobación incluye la creación de un nuevo hilo de ejecución, desde el cual se realizan peticiones periódicas de datos. Los valores obtenidos son guardados en el *array* de datos como paso previo a ser almacenados en fichero (Figura 53, página 74).

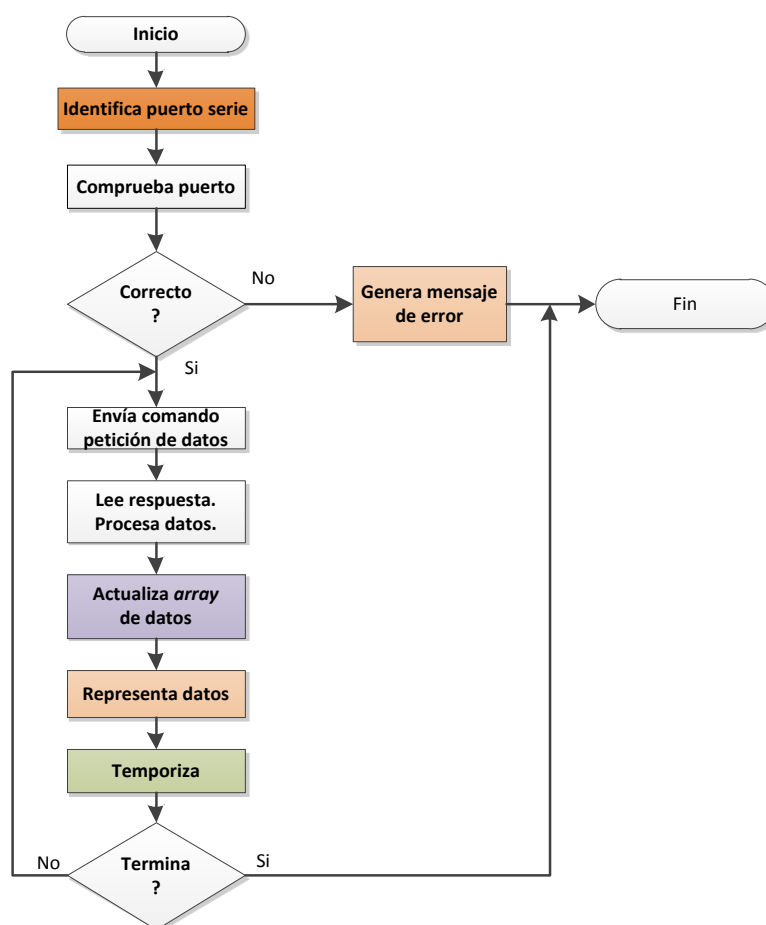


Figura 61 Algoritmo de comunicación con balanza

5.1.16 PROGRAMAS DESARROLLADOS

A continuación se comentan las particularidades que se considerado más relevantes de algunos de los programas desarrollados. Se recuerda al lector que en el Anexo IV se incluyen los manuales de usuario de estos y de otros programas, con información más detallada acerca de los mismos.

5.1.16.1 Programa *Comunicator*

Se trata de un programa desarrollado con *CVI*, y que en un primer momento se diseñó para emular el funcionamiento del equipo *Biostat*.

Se han programado una serie de respuestas similares a las que proporciona el equipo real y, de este modo, se ha facilitado el desarrollo de aplicaciones de control del equipo, sin necesidad de hacer uso del mismo.

En una segunda versión de este programa (Figura 62) se ha incluido una función que detecta el tipo de mensaje de comando recibido, y en caso de responder al

formato empleado por la balanza conforma una respuesta similar a la que generaría dicho equipo, a partir del valor de peso introducido en pantalla.

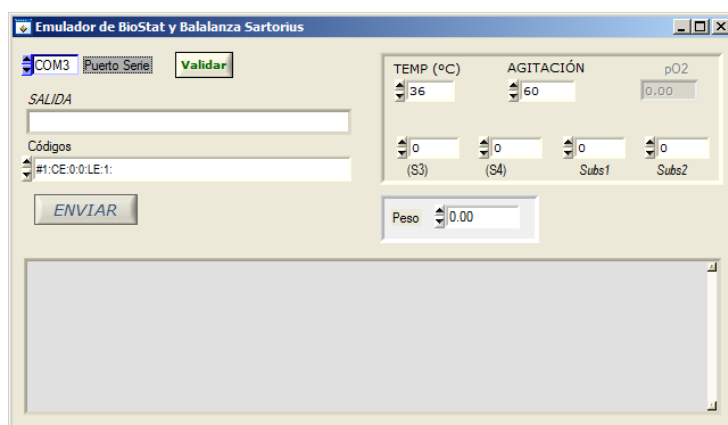


Figura 62 Panel de inicio del programa Comunicador v.2

Este tipo de programas de simulación facilita en gran medida el desarrollo de programas de control, dado que es posible realizar pruebas de comunicación y simulaciones de proceso de datos durante la depuración del software. Se reduce así el tiempo de experimentación con el equipo real, y se evitan acciones erróneas sobre el equipo durante la fase de pruebas, que a veces pueden ser motivos de fallos y averías por culpa de un mal uso.

5.1.16.2 Programa Reactores

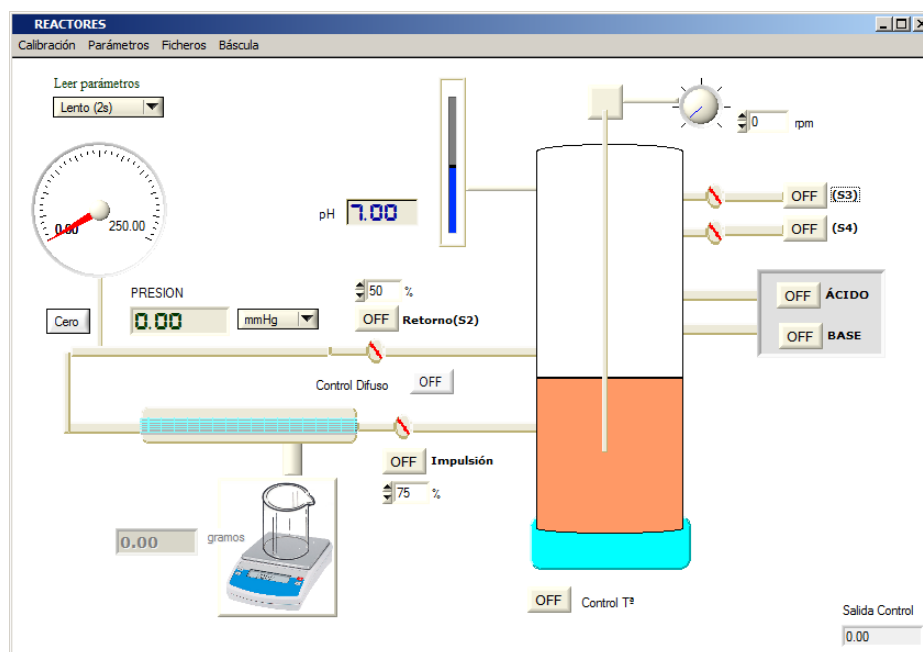


Figura 63 Interfaz de usuario del programa Reactores

Este programa cumple varios propósitos. Permite realizar diagnósticos, configurar el sistema, calibrar dispositivos y el ajuste de coeficientes. La Figura 63 muestra el aspecto del panel principal de dicho programa.

El programa *Reactores* incluye opciones para el manejo de un fichero *Excel* de configuración, que será usado por otros programas. También se incluyen opciones para registrar datos y realizar control de presión, por lo que es útil para simular procesos simples, incluidos los de absorción.

CALIBRACIÓN DE BOMBAS.

El programa *Reactores* permite calibrar las bombas peristálticas. La calibración de una bomba consiste en obtener el coeficiente que relaciona el volumen de líquido dosificado durante el intervalo de tiempo que se acciona dicha bomba. Dicho coeficiente se expresa en mL/min. Cada bomba tiene su propio coeficiente.

Dada una bomba peristáltica, si se acciona durante un intervalo de tiempo t_i , dosificará un volumen de líquido ΔV_i . En una primera aproximación, se puede estimar el coeficiente de la bomba C_i como resultado de la relación entre ambos valores.

$$C_i = \frac{\Delta V_i}{t_i} \quad (13)$$

Este valor puede variar de unas dosificaciones a otras, debido a varios motivos, tales como retardos de ejecución inherentes al sistema operativo, goteo de las gomas, posición inicial variable de los rodillos de la bomba peristáltica, etc. Para minimizar el error cometido en el cálculo del coeficiente se han adoptado dos estrategias:

- Realizar varias dosificaciones y promediar el resultado obtenido.
- Calcular dos coeficientes: uno para intervalos cortos de accionamiento (inferiores a 1 s) y otro para intervalos largos de accionamiento (mayores de 1 s)

El proceso de calibración para cada bomba empleado por el programa *Reactores*, consiste en realizar N dosificaciones consecutivas durante un intervalo de tiempo Δt_i . Una vez finalizadas estas N dosificaciones, el volumen total dosificado habrá sido V_N .

$$V_N = \sum_N \Delta V_i = N \cdot \Delta V_i \quad (14)$$

El coeficiente C de la bomba, para el intervalo de accionamiento t_i se calcula como el valor medio de los N coeficientes parciales C_i .

$$C = \frac{\sum C_i}{N} = \frac{1}{N} \times \frac{N \cdot \Delta V_i}{t_i} = \frac{V_N}{N \cdot t_i} \quad (15)$$

De la ecuación (15), el programa dispone del número N de dosificaciones realizadas y el intervalo de tiempo t_i , por tanto sólo necesita que el usuario introduzca el valor del volumen total dosificado para calcular el coeficiente.

		INTERVALO CORTO	INTERVALO LARGO
Intervalo de tiempo	t_i	0,8 s	2,5 s
Número de ciclos	N	20	10

Tabla 5 Valores óptimos en el cálculo del coeficiente de una bomba peristáltica

Las pruebas y ensayos empíricos realizados han permitido comprobar que con los valores recogidos en la Tabla 5 se consiguen errores totales inferiores a 1 mL en el cálculo del volumen dosificado durante los ensayos de simulación.

5.1.16.3 Programa CalibrapH

Se trata de una utilidad, desarrollada con *CVI*, con la finalidad de realizar la calibración del electrodo de pH, aunque también puede resultar útil como diagnóstico del sistema de control de pH (Figura 64).

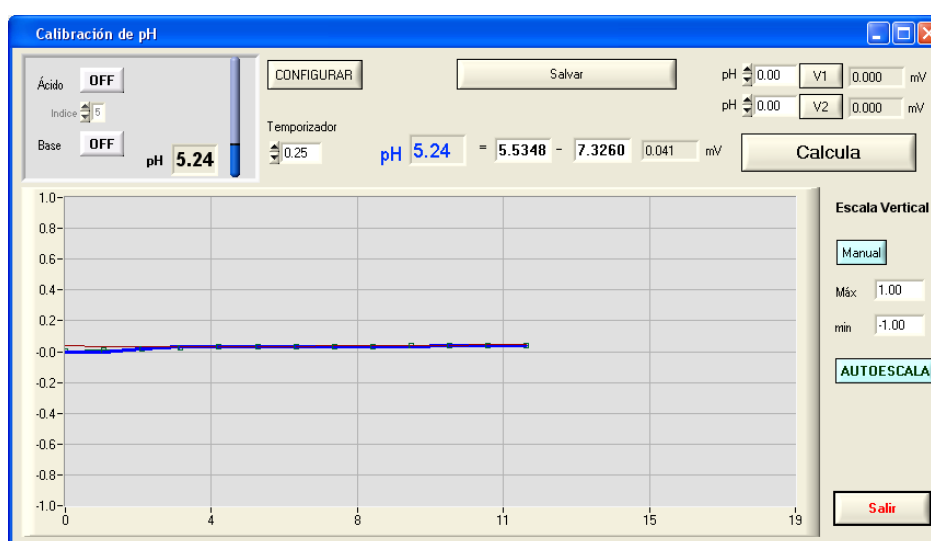


Figura 64 Interfaz de usuario del programa CalibrapH

Este programa hace uso del fichero *Excel* de configuración para leer o modificar los parámetros relacionados con la comunicación con el módulo de adquisición de datos y los coeficientes de calibración del electrodo de pH. Además es aplicable como herramienta universal para el diagnóstico y configuración de aplicaciones genéricas que hagan uso de la entrada analógica y las salidas digitales del módulo de adquisición de datos *i-7011*.

CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO DE pH.

Como ya se ha visto anteriormente, el electrodo de pH se conecta a un amplificador, cuya salida se conecta a su vez a un módulo de adquisición de datos que dispone de un convertidor analógico-digital. Cada vez que el ordenador realiza una operación de lectura del citado módulo, éste devuelve un valor numérico que se corresponde con la tensión V_{IN} aplicada a su entrada analógica, medida en mV. La expresión que relaciona dicho valor numérico con el valor de pH del medio en el cual está inmerso el electrodo responde a una ecuación lineal.

$$pH = a + b \cdot V_{IN} \quad (16)$$

La calibración del electrodo de pH es el proceso que permite calcular los parámetros de la ecuación (16) para obtener el valor de pH medido en todo momento, en función del valor de tensión leído por el módulo de adquisición de datos.

En el código de programa, al igual que en el fichero de datos, se usa el término *cero* para referirse a la constante de intersección a de la ecuación (16), mientras que la pendiente b de la recta se denomina genéricamente *coef*. Para calcular estos dos parámetros se realizan medidas en dos medios cuyos valores de pH son conocidos (pH_1 y pH_2). De este modo se obtienen los valores V_{IN1} y V_{IN2} respectivamente. Estas dos medidas se realizan siguiendo los pasos que se describen en el manual de usuario de este programa, incluido en el Anexo IV.

El programa calcula el parámetro *coef* (pendiente de la recta de calibración):

$$coef = \frac{pH_2 - pH_1}{V_{IN2} - V_{IN1}} \quad (17)$$

Posteriormente se calcula el parámetro *cero* (intersección de la recta con eje vertical):

$$cero = pH_1 - coef \cdot V_{IN1} \quad (18)$$

Una vez calculados los coeficientes, es fácil realizarla la conversión de tensión de entrada, V_{IN} , en valor de pH:

$$pH = cero + coef \cdot V_{IN} \quad (19)$$

Queda por último recordar que la recta definida por la ecuación (19) no se corresponde con la recta de sensibilidad del electrodo proporcionada por el fabricante, ya que está afectada por la etapa de amplificación y la conversión analógica-digital.

5.1.16.4 Programa *CalibraPresion*

De modo similar al programa *CalibrapH*, el programa *CalibraPresion* (Figura 65) permite diagnosticar el sistema de control de presión y calibrar sensores de presión. El programa incorpora también opciones para acceder al fichero *Excel* de configuración. El procedimiento para llevar a cabo la calibración de los sensores de presión es similar al descrito para la calibración de pH. Se necesita conocer la tensión de entrada que le corresponde a dos valores de presión conocidos para el cálculo de la recta de calibración de cada sensor. La calibración de un sensor de presión implica disponer en el mismo conducto o circuito hidráulico donde se realiza la medida de otro elemento de medida ya calibrado que proporcione valores fiables de las medidas de presión realizadas. Este elemento de medida se usa como patrón, o referencia de medida.

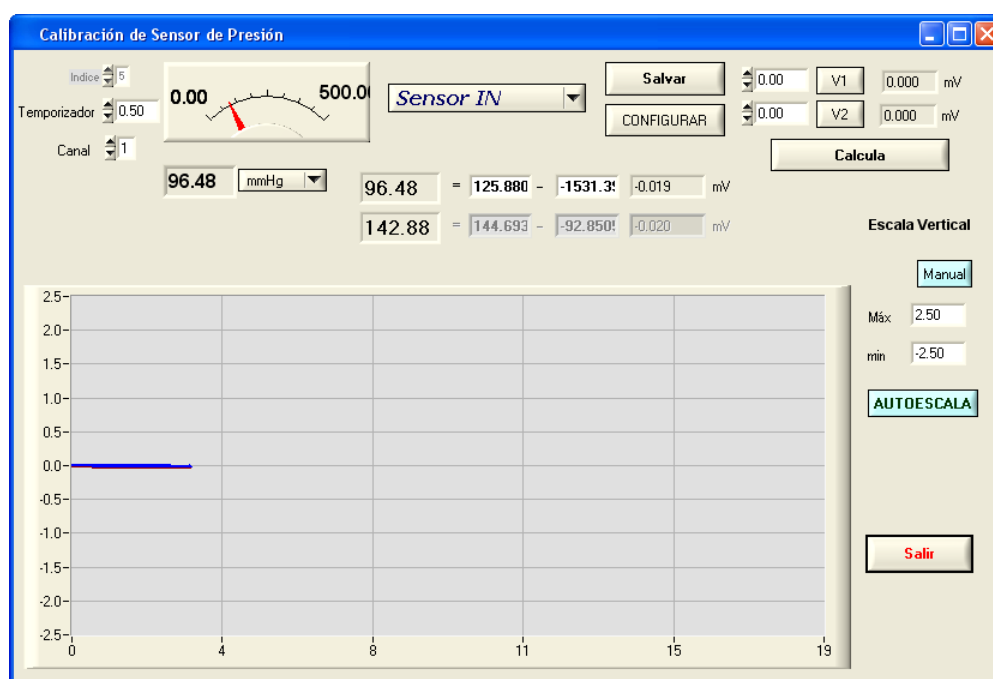


Figura 65 Interfaz de usuario del programa CALIBRAPRESION

Es importante tener presente siempre que la medida de cada sensor de presión no será más fiable que la medida proporcionada por el elemento patrón de referencia. En este contexto, el concepto de fiabilidad aplicado a la medida de un parámetro, hace referencia a cuánto se aproxima el valor medido al valor real del parámetro medido.

Aunque el interfaz de usuario está pensado inicialmente para configurar dos sensores de presión, es posible dar un uso más genérico a esta aplicación permitiendo calibrar cualquier sensor lineal conectado a cualquier entrada analógica de un módulo de adquisición de datos modelo *i-7017* o similar.

5.1.16.5 Programa *BioDigestor*

Se trata del programa principal. Permite el control y monitorización del sistema completo y la ejecución de los procesos de simulación descritos en los ensayos.

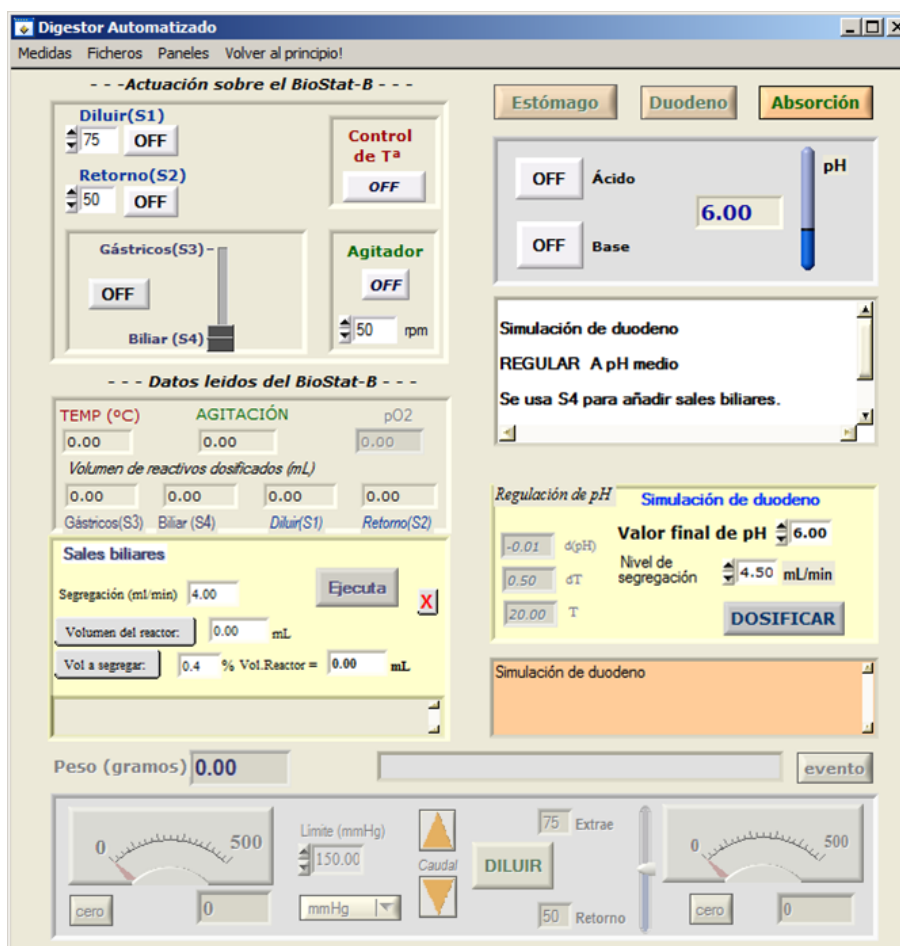


Figura 66 Interfaz de usuario del programa DIGESTOR

El programa *BioDigestor* (Figura 66) lee los parámetros de inicio del fichero *Excel* de configuración. Incluye paneles adicionales para gestión de volumen, análisis de la evolución de las medidas de pH y seguimiento de la información que se guardan en el fichero de datos. En el Anexo IV se incluye el manual de usuario de este programa, con información más detallada del mismo. En este apartado sólo se va a reseñar varias particularidades relacionadas con la dosificación de reactivos, que se han considerado de interés.

REGULAR pH DOSIFICANDO ÁCIDO O BASE

La Figura 67 muestra el panel relacionado con la ejecución del algoritmo descrito en el apartado 5.1.12 de este capítulo, página 75.

Previo a la fase de simulación gástrica, este panel es usado por el usuario para configurar el nivel de segregación simulada de ácido gástrico, que se corresponde con el caudal de la bomba asociada, y el valor final de pH que supone el fin de la secreción gástrica.

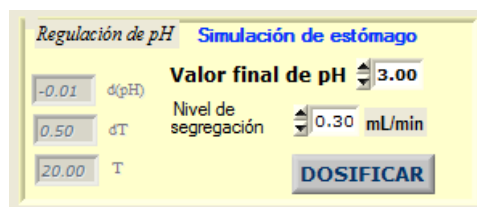


Figura 67 Programa BioDigestor: Panel de regulación de pH

Previo a simular la secreción de base que el páncreas aporta al duodeno, el programa *BioDigestor* reconfigura automáticamente el panel de regulación de pH para adaptarlo a los parámetros propios de esta fase de simulación, incluido el cambio correspondiente en el rótulo que identifica al panel.

La automatización de este proceso simplifica al investigador la ejecución de estas fases de simulación del proceso digestivo, de modo que sólo tiene que verificar unos pocos parámetros antes de iniciar la ejecución del proceso, con la ventaja añadida de que en cualquier momento se puede detener la simulación o modificar algún parámetro.

Además, al estar basado el proceso en medir las variaciones de pH, es posible emplear distintas bases y concentraciones (Sumeri, 2008; Mainville, 2005). Una vez que se realiza la simulación el investigador dispone del fichero de registro de datos para obtener el volumen aportado de cada reactivo por unidad de tiempo.

REGULAR pH DURANTE LA SIMULACIÓN DEL INTESTINO DELGADO.

La Figura 68 muestra el panel relacionado con la regulación de pH durante la simulación del intestino delgado. Este proceso de regulación difiere del proceso de regulación que simula la secreción pancreática, motivo por el que se le asigna un panel distinto. Durante la simulación de secreción pancreática el objetivo es alcanzar un valor de pH determinado. Alcanzado ese valor, se da por neutralizado el ácido añadido previamente al quimo. La simulación del intestino delgado es un proceso distinto, en el que el objetivo es mantener el pH por encima de un valor concreto.

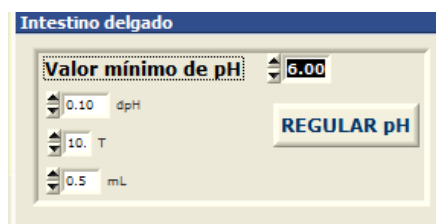


Figura 68 Programa BioDigestor: Panel de regulación de pH durante la simulación del intestino delgado

Durante esta fase de simulación, las variaciones de pH son debidas a reacciones químicas en el biorreactor. El fichero de registro de datos proporciona información sobre la cantidad de base aportada. Existen estudios que permiten evaluar los lípidos digeridos (Nolasco, 2006) aplicando ecuaciones de balance químico.

DOSIFICAR OTROS REACTIVOS.

La Figura 69 muestra el panel relacionado con la ejecución del algoritmo descrito en el apartado 5.1.14 de este capítulo, página 80.

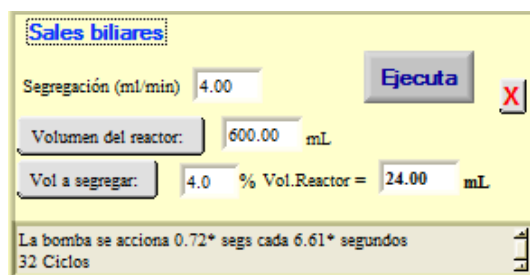


Figura 69 Programa BioDigestor: Panel de dosificación de reactivos

Este panel está asociado a una bomba peristáltica concreta. Para hacer referencia a dicha bomba, en el fichero de configuración se le asigna el nombre del reactivo que dosifica.

El volumen de reactivo a dosificar se puede introducir manualmente o permitir que el programa lo calcule en función del volumen del contenido del reactor.

La versión actual del programa *BioDigestor* sólo contempla la dosificación de dos reactivos, además de ácido y base. En futuras ampliaciones del sistema está contemplado añadir más dispositivos de dosificación. Para el usuario de la aplicación la forma de programar la dosificación de cada reactivo será similar, pues dispondrá de un panel similar al mostrado en la figura, con el único requisito previo de haber actualizado previamente el fichero de configuración con los parámetros adecuados.

5.2 FUNCIONAMIENTO

Este subcapítulo recopila medidas, pruebas y ensayos relacionados con el funcionamiento del sistema. El primero de los apartados que siguen resume los parámetros físicos que son medidos y registrados, confirmando que se ha podido automatizar el uso de los reactores. El apartado de pruebas de usuario confirma que las aplicaciones informáticas disponen de interfaces de usuario accesibles. Los ensayos posteriores validan el correcto funcionamiento de los subsistemas.

5.2.1 MEDIDAS REALIZADAS Y RANGO DE PARÁMETROS

La Tabla 4 resume los principales parámetros físicos que se han medido y registrado durante los procesos de simulación. Los ficheros generados en cada ensayo recogen estos parámetros, entre otros datos.

Se indican las acciones más usuales relacionadas con estos parámetros así como el rango y la resolución de los valores medidos.

PARÁMETRO	ACCIÓN	MARGEN DE VALORES	RESOLUCIÓN
Temperatura	Mantener en un valor fijo	$36,6 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$	0,1 $^{\circ}\text{C}$
Acidez / Alcalinidad	Medir Regular	Mín. pH 2 Máx. pH 12	0,01
Agitación	Mantener estable	Mín. 50 rpm Típico 75 rpm Máx. 120 rpm	1 rpm
Caudal	Dosificar reactivos Desplazamiento	mL/min según bomba	0,1 mL
Presión	Medir Regular	En torno a 50 mmHg Máx. 250 mmHg	1 mmHg
Peso	Medir	Máx 5.000 g	0,01 g

Tabla 6 Rango y resolución de parámetros medidos

Conviene recordar que aunque se hable de modo genérico de *medidas de presión*, lo que se mide y registran son variaciones de presión en torno a la presión atmosférica.

5.2.1.1 Discusión sobre el rango de algunos parámetros.

La agitación del tanque pretende emular las contracciones del músculo gastrointestinal, a la vez que es un requisito necesario para realizar una correcta medida del valor de pH y temperatura del contenido del reactor. Durante las fases de simulación del estómago y del duodeno el objetivo es garantizar una buena mezcla de los alimentos y jugos corporales. Se ha comprobado de modo experimental que una velocidad de rotación comprendida entre 50 y 70 rpm es adecuada para obtener una mezcla uniforme del contenido del reactor. Solo se aconseja el empleo de velocidades de rotación de la turbina por encima de 70 rpm en caso de que el contenido del reactor sea muy denso o viscoso. Se ha podido evaluar experimentalmente que velocidades de rotación superior a 100 rpm, además de no corresponderse con los parámetros fisiológicos simulados, originan turbulencias en el seno del reactor que se traducen en medidas erróneas de pH. En cuanto al rango de las medidas de presión, como ya se ha comentado anteriormente, hay estudios sobre motilidad intestinal (Camilleri, 1998; Haster, 2006) que determinan variaciones de presión en el intestino delgado del orden de 50 mmHg con respecto a la presión atmosférica y variaciones de presión no superiores a 100 mmHg durante las contracciones del colon (Sarna, 2006). Se ha considerado apropiado que el sistema pueda registrar valores mayores de presión para facilitar los procesos de ajuste y regulación, o ensayos en los que se necesita experimentar con variaciones de presión superiores que pueden ser requeridas por las características propias de las membranas usadas. Es por ello que se ha establecido que el sistema registre variaciones de presión de hasta 200 mmHg.

En el apartado 4.2 del capítulo anterior se han expuesto los reactivos usados para simular los fluidos corporales así como los valores de caudal que se usan habitualmente. El sistema adapta el control de las bombas peristálticas para dosificar dichos valores. En apartado posterior se explica cómo se regula la presión variando los caudales de las bombas de impulsión y de retorno. En los ensayos realizados el caudal de estas bombas suele variar entre 15 y 30 mL/min. Se han realizado ensayos con colorantes para medir el tiempo que tarda el líquido en atravesar el módulo tubular de filtración. Para un caudal de impulsión de 25 mL/min se ha comprobado que el líquido tarda 1min y 10 s en atravesar el módulo, cuya longitud es de 1,20 cm. Por tanto la velocidad de avance del líquido que simula al quimo es de 1,7 cm/s.

La velocidad de impulsión del quimo en el intestino delgado varía entre 0,5 y 2 cm/s (Guyton, 2001), por tanto los caudales empleados en la fase de simulación de absorción intestinal guardan relación con la velocidad real de avance del quimo en el sistema digestivo humano.

5.2.2 PRUEBAS DE USUARIO

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han desarrollado una serie de aplicaciones informáticas que han sido comentadas en los apartados anteriores y cuyos manuales de usuario se incluyen en el anexo.

Para mejorar la usabilidad de las interfaces de usuario, se han realizado pruebas de usuario, según la técnica “*Thinking Aloud*” (*pensar en voz alta*) durante las primeras fases de desarrollo y coincidiendo con los ensayos preliminares.

Dicha técnica se define como “un test en el que se le pide al participante que use un sistema mientras piensa continuamente en voz alta, verbalizando sus pensamientos mientras se mueve por la interfaz de usuario” (Nielsen, 1993).

OBSERVACIONES	MEJORAS REALIZADAS
Identificación de botones. Debe quedar clara la acción a realizar.	Resaltar pulsadores y conmutadores. Etiquetas claras, con acciones concretas.
Comprensión de las opciones de menú	Se reagrupan opciones de menú y se revisan todas las etiquetas asociadas.
Visualizar unidades.	Se añaden campos de texto para que esté identificado el parámetro asociado a cada campo numérico así como su unidad de medida
Información en pantalla confusa	Se muestra información auxiliar en campos de texto muy próximos al control relacionado con dicha información.
Paneles emergentes	Se cuida, en la medida de lo posible, que los paneles emergentes y ventanas auxiliares se muestren superpuestos al panel principal.

Tabla 7 Observaciones realizadas por usuarios “químicos”

Se ha recurrido a grupos de voluntarios con dos perfiles distintos:

- Usuario habitual de un laboratorio de ingeniería química con conocimientos sobre bioquímica (poco familiarizado con el diseño electrónico).
- Usuario con formación en electrónica, familiarizado con el uso de sistemas de adquisición de datos e interfaces de usuario (poco familiarizado con aplicaciones químicas).

En las tablas adjuntas se resumen las mejoras consideradas más relevantes aportadas por los usuarios. La Tabla 7 muestra las principales observaciones

realizadas por usuarios que responden a un perfil “químico” y la Tabla 8 muestra las observaciones que se ha considerado más relevantes por parte de usuarios de perfil “electrónico”.

OBSERVACIONES	MEJORAS REALIZADAS
Diferenciar indicadores de entradas de datos	El aspecto de cada control numérico se adecúa al modo de operación. Todos los controles tienen un único color de fondo en función de si son solo indicadores o admiten entrada de datos.
Posible uso del botón derecho del ratón (para menú de ayuda, por ejemplo)	Se habilita un panel de ayuda al pulsar el botón derecho en determinados controles y recuadros.
Restringir las entradas numéricas a valores máximos y mínimos	Uso de la opción “coerce” en el autochequeo de rango, (opción de CVI) para todos los controles numéricos.
Escala vertical en gráficas	Se reajusta automáticamente la escala vertical en las gráficas en función del rango de medida seleccionado para el módulo de adquisición de datos.
Evolución de los procesos	Se añaden ventanas de texto y se incluyen comentarios que indican la evolución del proceso, tiempo estimado de duración, número de ciclos, etc.

Tabla 8 Observaciones realizadas por usuarios “electrónicos”

5.2.3 MEDIDA DE pH

La conversión de valores analógicos (potencial eléctrico medido en el electrodo de pH) a valores digitales (datos numéricos que procesa el ordenador) se ve afectada por errores de medida y oscilaciones, inherentes al sistema, así como interferencias electromagnéticas producidas por dispositivos eléctricos cercanos al equipo de medida. Para minimizar estos efectos es conveniente realizar promedios de las medidas realizadas, a fin de obtener un valor de pH estable y fidedigno.

El promedio se consigue almacenando el valor analógico obtenido en un *array*, de manera que siempre estén disponibles los *n* últimos datos adquiridos, sobre los cuales se aplica el algoritmo que proceda.

En la gráfica de la Figura 70 se representa una señal adquirida en tiempo real (traza de color rojo) sobre la que se han provocado variaciones bruscas. El intervalo de muestreo es de 0,20 s. La traza de color verde representa el valor medio de la señal adquirida. La traza azul representa el valor mediano. Ambos valores se han obtenido de aplicar los correspondientes filtros sobre los últimos seis valores adquiridos.

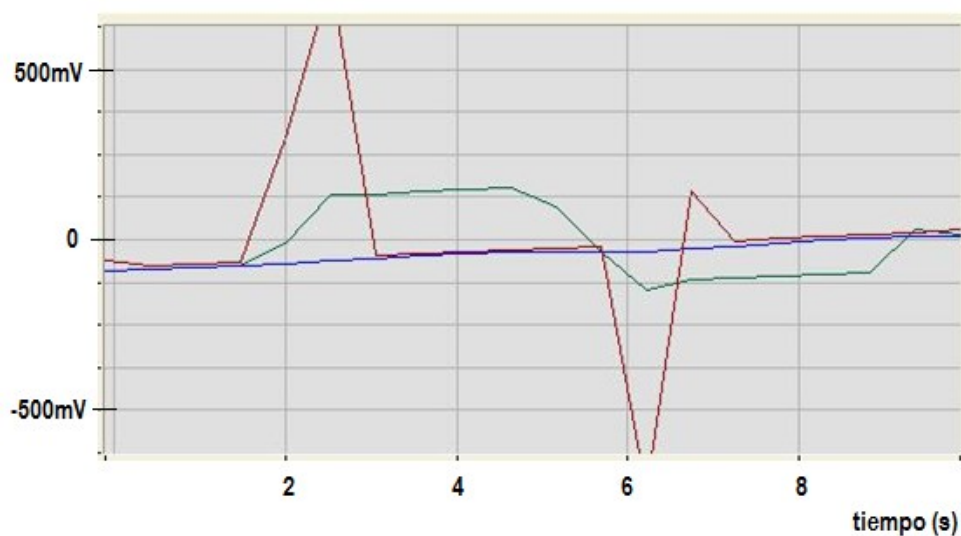


Figura 70 Medida de pH (1)

Traza verde $\rightarrow x_{medio} = \frac{\sum_{i=0}^{n-1} x_i}{n}$ (20)

Traza azul $\rightarrow x_{mediano} = 0.5 \times \left(S\left(\frac{n}{2}-1\right) + S\left(\frac{n}{2}\right) \right)$ (21)

Como se puede apreciar, con el filtro de mediana se consigue un sistema inmune (indiferente) a transitorios puntuales.

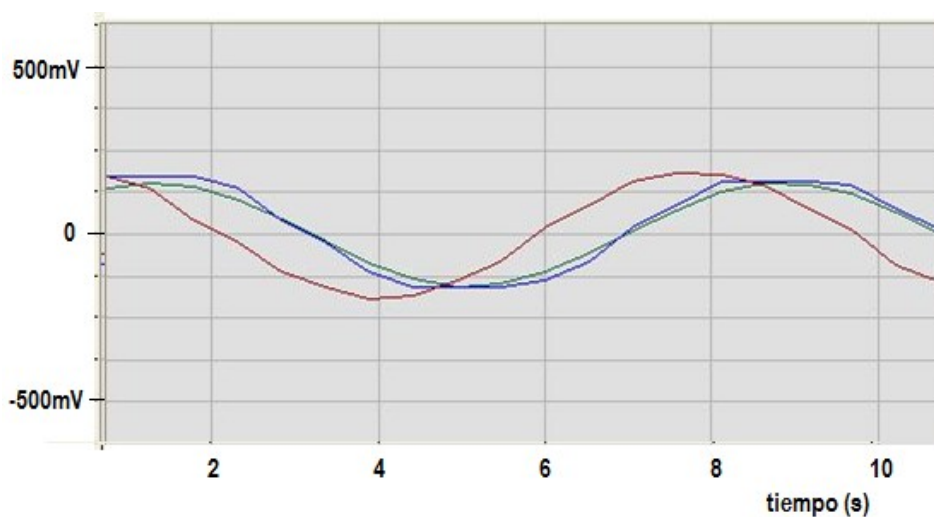


Figura 71 Medida de pH (2)

Como resultado de aplicar filtros a la señal, ya sea de valor medio o de mediana, las señales resultantes se obtienen desfasadas (retrasadas) con respecto a la

original, tal como se aprecia en la Figura 71. Este desfase está determinado por el número de muestras que se promedian.

El tiempo de respuesta del electrodo de pH se mide en minutos, mientras que el intervalo de medidas se mide en segundos o décimas de segundos. Por lo tanto, el retraso ocasionado por el promediado de 6 muestras no es significativo.

En el ejemplo mostrado en la Figura 72 solo se analizan las tres últimas muestras en cada adquisición de datos. Se observa cómo la mediana (color azul) se aproxima al valor medio y se ha perdido inmunidad frente a cambios bruscos puntuales.

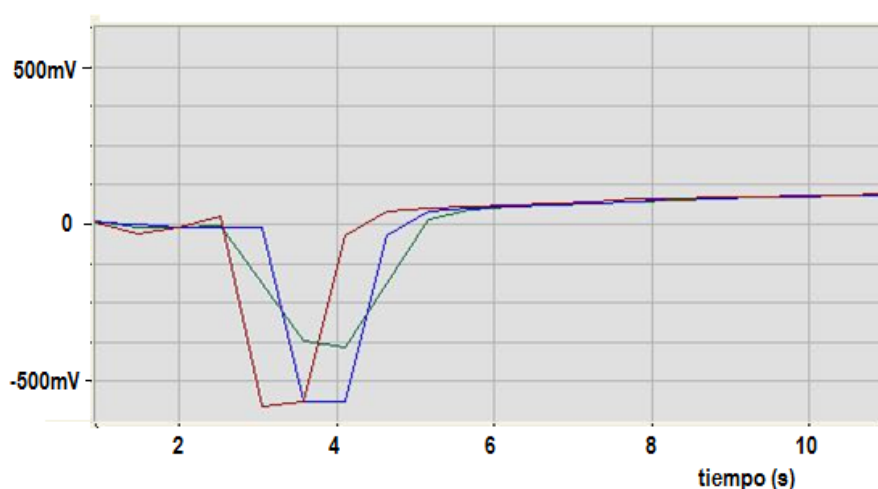


Figura 72 Medida de pH (3)

De este ensayo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El filtro de mediana proporciona al sistema de adquisición de datos una mayor protección e inmunidad frente a perturbaciones eléctricas y transitorias que el promediado aritmético (Figura 70).
- El promedio de un número alto de muestras puede provocar desfases y retardos significativos en la medida (Figura 71).
- El promedio de un número bajo de muestras no protege adecuadamente contra transitorios y errores de medida (Figura 72).
- Los experimentos realizados demuestran que un número de muestras entre 4 y 8 es adecuado y suficiente para realizar promedios. Para las velocidades de muestreo empleadas habitualmente en los ensayos realizados, el valor óptimo es de 6 muestras para promediar las medidas de pH.

5.2.4 RELACIÓN ENTRE VARIACIONES DE PRESIÓN Y ABSORCIÓN

Se han realizado varias pruebas con agua para determinar las relaciones existentes entre el caudal de las bombas que ceban/drenan el módulo tubular de membrana. Se ha podido comprobar que el volumen filtrado por unidad de tiempo guarda relación con la presión, y esta a su vez con la diferencia de caudales.

La traza azul de la Figura 73 representa los valores obtenidos de la salida del sensor de presión ubicado en el circuito de retorno, sin promediar. Las trazas rojas representan son medidas en gramos de producto filtrado. El eje horizontal representa tiempo (minutos).

Condiciones de caudal de cada tramo:

Tramo 1: Impulsión = 27 mL/min.
Retorno = 7,2 mL/min

Tramo 2: Impulsión = 30,24 mL/min
Retorno = 5,4 mL/min

Tramo 3: Impulsión = 19,08 mL/min
Retorno = 16,56 mL/min

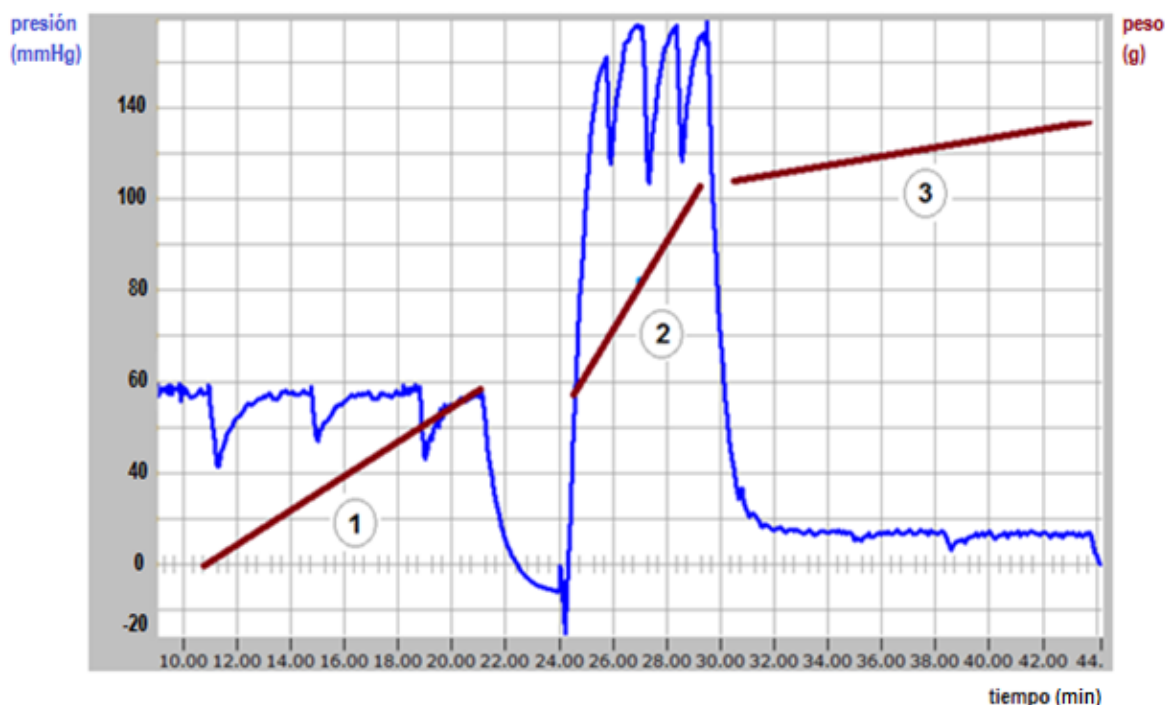


Figura 73 Medidas de presión y registro de peso (1)

Estos valores pueden cambiar dependiendo del tipo de fluido y de la porosidad de la membrana usada, entre otros factores, y no es objeto de este trabajo determinar la relación exacta entre estos parámetros. En cualquier caso, se comprueba que la cantidad de producto filtrado por unidad de tiempo guarda relación de proporcionalidad con la presión del circuito hidráulico de retorno. Se puede concluir que la presión en los circuitos hidráulicos se puede regular variando los caudales de las bombas peristálticas de impulsión y de retorno, así como la cantidad de producto filtrado por unidad de tiempo. La variación del ciclo de trabajo de cada bomba en un método válido para modificar su caudal.

5.2.5 CONTROL DE PRESIÓN

La Figura 74 muestra el resultado de un ensayo en el que se ha realizado una regulación de presión usando un método simple, basado en comparar la medida de presión con un valor de consigna establecido. Si la presión es superior a dicho valor se detiene la bomba de impulsión y no se reanuda su funcionamiento hasta que la presión medida sea inferior al valor consignado.

La traza azul se corresponde con valores de variaciones de presión, medidos en mmHg. La traza roja es peso de producto filtrado, medido en gramos. El eje de abscisas es tiempo, medido en minutos. Se han marcado varios ítems con círculos amarillos en dicha gráfica para analizar la evolución del proceso.

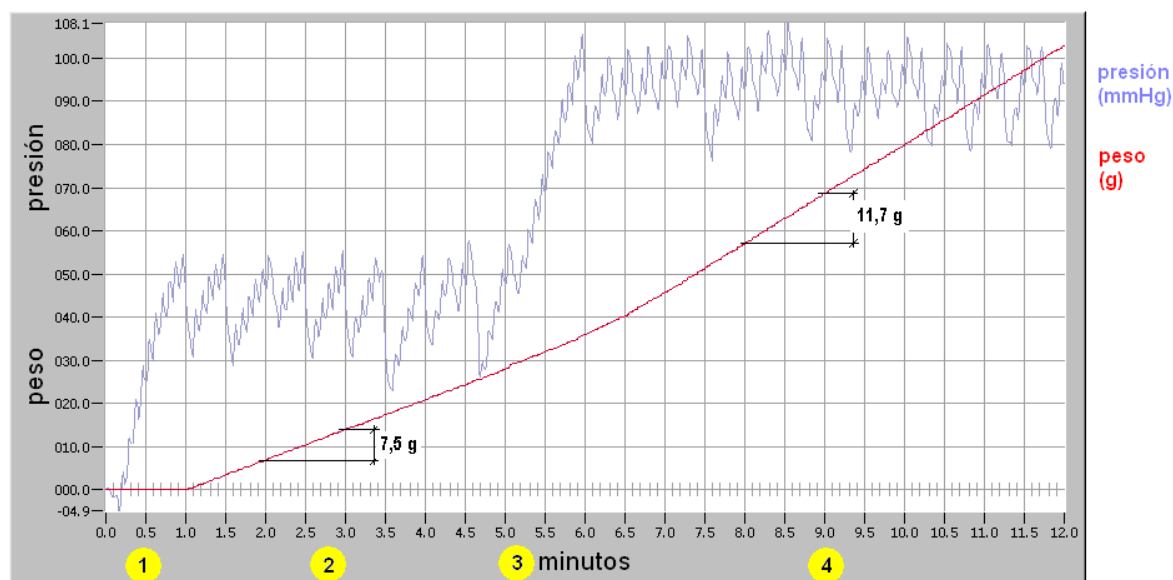


Figura 74 Medidas de presión y registro de peso (2)

Tramo 1. El elemento de filtración está parcialmente vacío y hay líquido en los conductos de comprobaciones previas. La representación del registro de valores se inicia cuando comienzan a observarse variaciones de presión en los conductos hidráulicos. Un tiempo después comienza a

obtenerse producto filtrado. Este tiempo está relacionado con la capacidad de absorción de la membrana y con el tiempo que tarda en recorrer el producto filtrado los conductos de salida hasta el recipiente donde se pesan.

Tramo 2. El aumento de presión en el módulo tubular de membrana conlleva un ritmo de salida de producto filtrado lineal, de 7,5 g/min. La presión máxima está limitada en el programa de control a 50 mmHg.

Tramo 3. Se modifica en el programa de control el límite de presión máxima a 100 mmHg.

Tramo 4. El aumento de presión conlleva un aumento del caudal másico de producto filtrado a 11,7 g/min.

El diente de sierra que se aprecia es motivado por la activación y corte de las bombas, y además actúa la limitación por programa de presión máxima. Esta limitación se traduce en un corte momentáneo de la bomba de impulsión.

Durante todo el ensayo la bomba de impulsión ha estado configurada para un caudal de 22 mL/min y la bomba de retorno ha estado programada en 17 mL/min.

Este ensayo permite concluir que el método simple de activar o desactivar la bomba de impulsión en función del resultado de la comparación entre la medida de presión y el valor de consigna es un método válido para conseguir valores estables de variaciones de presión.

5.2.5.1 Discusión sobre el aspecto de la curva de presión

La Figura 75 muestra una ampliación de una porción de la gráfica de presión de la Figura 74, en torno al minuto 8. Para entender mejor el *dentado* de la curva de la figura, basta con recordar el mecanismo de la bomba peristáltica de impulsión (Figura 76).

Hay pequeñas variaciones de presión relacionadas con la acción de los rodillos del mecanismo impulsor sobre el conducto flexible. Dependiendo de si actúa la bomba impulsora o la bomba de retorno, este dentado es más acusado.

Observando la figura, se podría deducir cuándo está funcionando el mecanismo de impulsión (pendiente positiva), cuándo actúa el elemento de retorno (pendiente negativa) y cuando están funcionando ambas simultáneamente (pendiente moderada).

Por otro lado, supuestamente la presión está limitada por software a 50 mmHg, pero sin embargo se registran valores superiores. Hay dos motivos que lo explican.

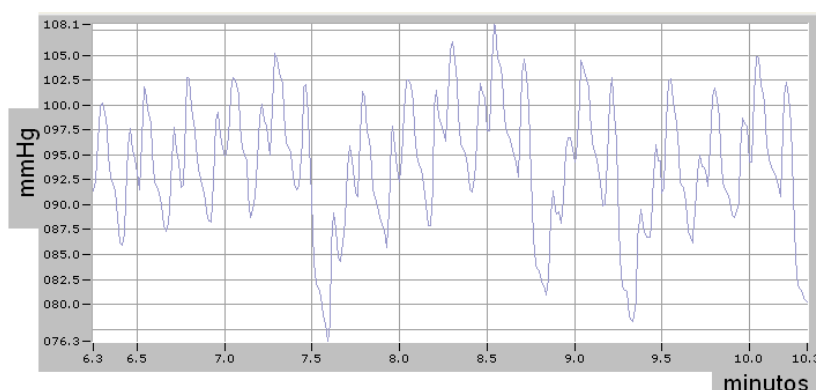


Figura 75 Detalle de medida de presión

El algoritmo de control está implementado de forma que cuando se lee una presión que supera un valor determinado, se genera un comando que es enviado al equipo *Biostat*. Dicho de otro modo, se actúa una vez superada la presión establecida como consigna. Teniendo en cuenta que el sistema informático toma medidas de presión cada cierto tiempo, si la velocidad con que varía la señal medida es muy rápida, es posible un incremento de presión considerable en los intervalos de medida. También hay que tener en cuenta que el equipo *Biostat* tiene un tiempo de retardo, desde que se envía el comando de control hasta que dicho comando se ejecuta.



Figura 76 Detalle de dispositivo peristáltico

Resumiendo: el sistema *tarda* un cierto tiempo en reaccionar a una situación de sobrepresión. Un posible modo de corregirlo, si fuese preciso, es tabulando as variaciones de presión durante los intervalos de cierre, para distintos caudales. Estas variaciones se pueden restar de forma automática al punto de consigna establecido.

La Figura 77 muestra los mismos valores de presión mostrados en la Figura 74 en color claro, y superpuesto sobre los mismos, en color negro, el resultado de aplicar a posteriori un filtro de mediana a dichos valores, usando $n = 20$.

Se observa que, tal como se esperaba, el valor máximo de presión promediada no supera los 50 mmHg.

De los resultados obtenidos se concluye que no es estrictamente necesario promediar la presión durante el proceso de adquisición de datos, pudiendo hacerlo a la hora de representar gráficamente la información obtenida.

Se ha realizado pruebas similares usando distintos valores de velocidad de lectura de medida de presión, y se ha comprobado de modo experimental que se obtienen resultados aceptables cuando el tiempo entre adquisiciones de datos consecutivas varía entre 0,5 y 1 s.

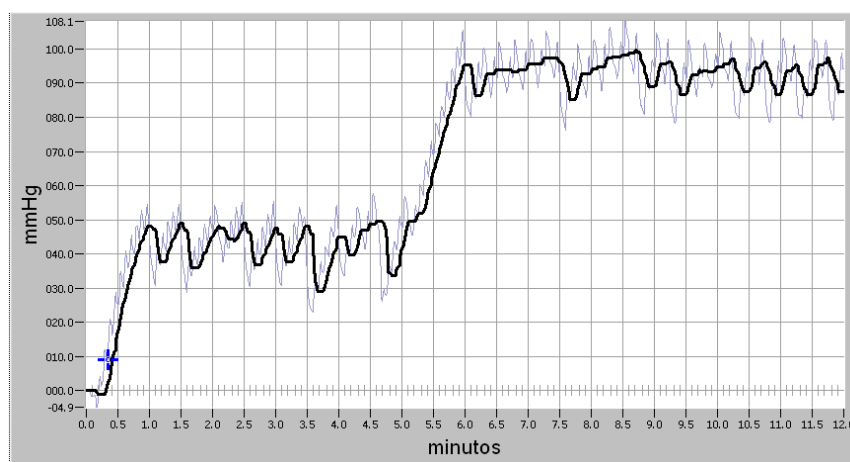


Figura 77 Representación de medidas de presión y señal promediada

5.2.6 SIMULACIÓN GASTRODUODENAL

Este ensayo simula las fases de digestión gástrica y digestión duodenal posteriores a la ingesta de un vaso de leche. La finalidad de este ensayo es describir el procedimiento a seguir para realizar este tipo de simulaciones, a la vez que validar la utilidad del programa *BioDigestor* para este fin.

5.2.6.1 Descripción del ensayo

En la Figura 78 se muestra información de la evolución de los parámetros considerados más importantes. Todas las gráficas se corresponden con la misma base de tiempo (eje horizontal) y se han numerado una serie de ítems que determinan la evolución del ensayo (círculos amarillos).

El tanque agitado contiene 600 mL de medio ácido formado por agua desionizada más HCl, con pH 3 aproximadamente. Se añade manualmente 150 mL de leche (ítem 1) simulando la ingesta de alimento. Se cierran todas las entradas no usadas al tanque. Para este tipo de ensayos no es necesario sellar herméticamente el recipiente. Para mantener el contenido del reactor en

condiciones anaeróbicas se inyecta en el espacio de cabeza N_2 que desplaza el aire.

Se inicia la fase de simulación gástrica (ítem 2), adicionando HCl 1M a razón de 0,6 mL/min. Esta fase termina (ítem 3) cuando se alcanza el valor de pH 3. La fase ha durado 38 minutos (aproximadamente) y se ha añadido en total 12,15 mL de ácido. Se inicia la fase de simulación duodenal (ítem 4) añadiendo 4,5 mL/min de $NaCOH_3$ 1M hasta alcanzar pH 6 (en total 27,50 mL durante 6,7 minutos). Cuando se supera en el reactor el valor de pH 5 (ítem 5) se añaden sales biliares (B8756 Fluka) diluidas al 0,4%, a razón de 4 mL/min, hasta alcanzar el 4% del volumen del reactor. En total se dosifican 25,10 mL. La simulación gastroduodenal concluye cuando termina la fase de regulación de pH y la dosificación de las sales biliares (ítem 6).

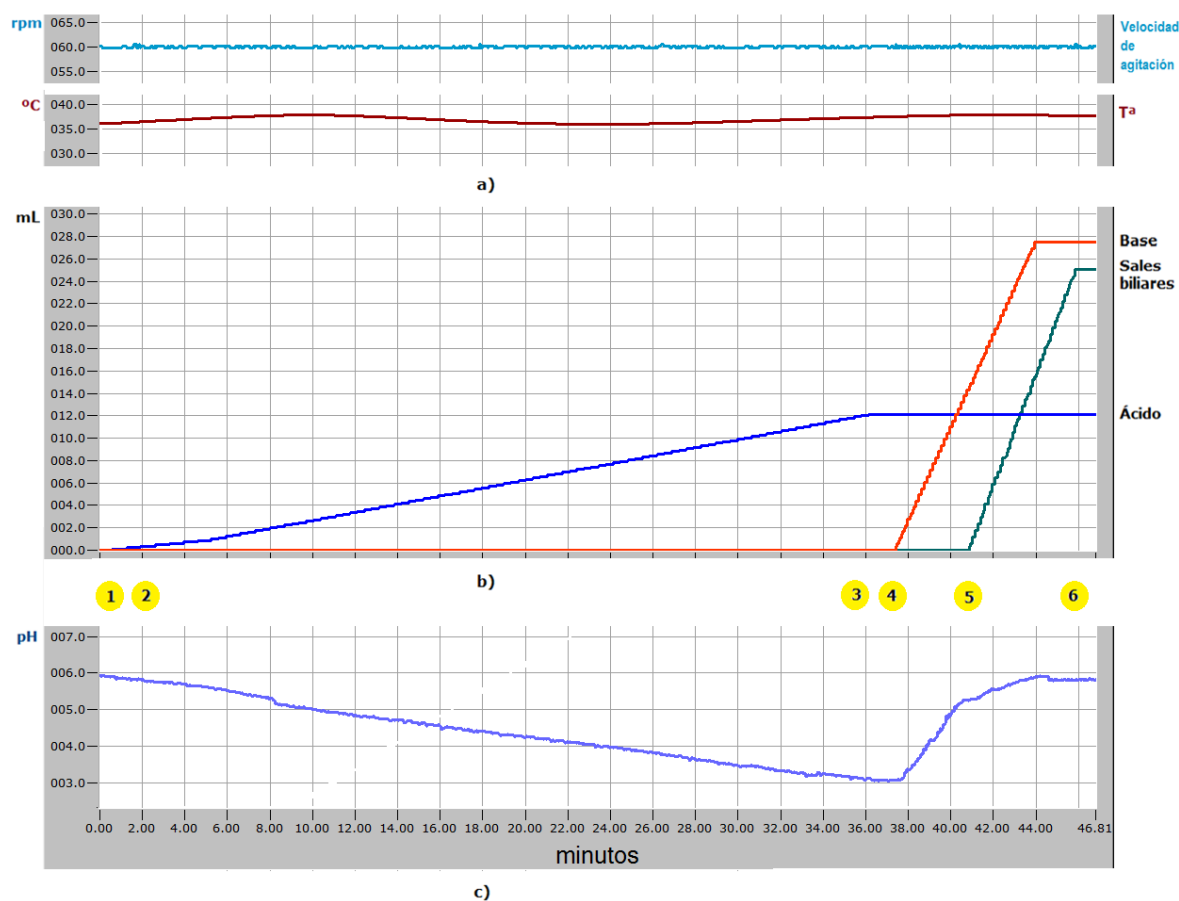


Figura 78 Simulación de fase gastroduodenal. Representación de datos registrados

Durante todo el proceso se ha mantenido constante la velocidad de rotación de la turbina que agita el contenido del reactor en 60 rpm. La temperatura, regulada por el equipo *Biostat*, se ha fijado en $36,6 \pm 1$ °C.

5.2.6.2 Datos registrados

Durante la evolución de la simulación, el programa utilizado permite registrar una serie de datos en un fichero. Con estos datos se han obtenido a posteriori las gráficas mostradas en la Figura 78.

La Figura 78a muestra la evolución de la velocidad de giro de la turbina, medida en rpm, y la evolución de la temperatura en el interior del tanque. Estos parámetros se configuran desde el programa *BioDigestor* pero el control es realizado por el equipo *Biostat*. Cada cierto tiempo, el programa interroga a la unidad de control del citado equipo que, a su vez, devuelve un mensaje con información de parámetros.

La Figura 78b representa el volumen (mL) de reactivos dosificados.

La Figura 78c muestra la evolución del pH medido.

DISCUSIÓN.

Con la aplicación informática desarrollada es posible realizar simulaciones del tracto gastrointestinal. Además permite configurar una serie de parámetros y realizar el registro de datos obtenidos durante las fases que conforman el proceso de simulación. Resulta fácil y simple analizar estos datos con posterioridad.

5.3 APLICACIONES

5.3.1 ESTUDIO DEL PUNTO DE LIBERACIÓN DE CÁPSULAS BLANDAS

En la industria farmacéutica es habitual el uso de cápsulas blandas para la administración de fármacos por vía oral. Este tipo de cápsulas se suelen diseñar de una sola pieza y selladas herméticamente. El recubrimiento exterior está compuesto por mezclas de gelatina, agua y plastificante, en diferentes proporciones para lograr las propiedades deseadas de elasticidad y suavidad. También se usan agentes colorantes o de opacidad, que contribuyen a diferenciar el producto.



Figura 79 Ejemplo de cápsulas blandas

El uso de distintos tipos de gelatinas, ácidas o alcalinas, y la proporción de mezcla con pectina, determina el tiempo de liberación del contenido de la cápsula por rotura del encapsulado. En este sentido, el sistema propuesto en esta Tesis Doctoral resulta de gran interés para que empresas que diseñan cápsulas blandas puedan testar sus mezclas. Tal es el caso del ensayo que se propone, en el que se analizan diversos encapsulados de un preparado alimenticio que contiene aceites grasos ricos en Omega-3. Para que sean efectivas, las cápsulas deben romperse en el estómago, pero con un tiempo de liberación lo suficientemente largo como para evitar el reflujo.

En los ensayos que se describen en esta memoria se han estudiado tres tipos de encapsulados, denominados genéricamente A, B y C, y cuyo aspecto se muestra en la Figura 80. Para todos los ensayos se ha seguido procedimiento similar al descrito a continuación.

5.3.1.1 Descripción del ensayo

Se emplea un reactor de tanque agitado que contiene 600 mL de medio ácido compuesto de agua desionizada y HCl, con un pH inferior a 4. En el instante de añadir la cápsula este medio simula el estómago vacío, justo después de ingerir un vaso de agua. El contenido del reactor se encuentra agitado por una turbina que gira a 60 rpm y regulado a temperatura de $36,6 \pm 1$ °C. El proceso se realiza haciendo uso del programa *Digestor*. En el instante de añadir la cápsula al reactor se formaliza el correspondiente comentario desde la interfaz de usuario. De este modo, es posible identificar posteriormente dicho momento cuando se analicen los datos registrados.

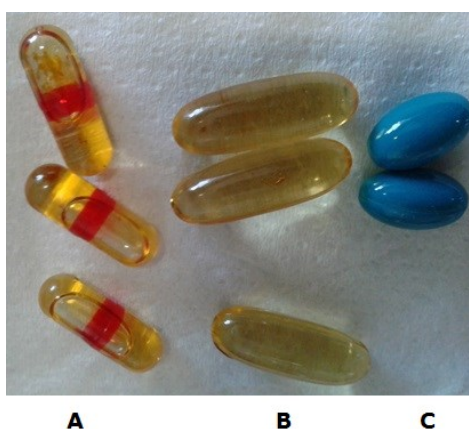


Figura 80 Cápsulas usadas en el ensayo

A continuación se inicia la fase de simulación gástrica dosificando 0,6 mL/min de HCl 1M, hasta alcanzar el valor de pH 3. De forma adicional, se ha colocado una *web-cam* en la base del vaso reactor, enfocada hacia el interior del mismo (Figura 81), de forma que es posible obtener imágenes en modo manual de la evolución de los encapsulados.



Figura 81 Detalle de colocación de web-cam

Cada vez que se desea capturar una imagen se detiene momentáneamente la agitación. Con ello se consigue un doble objetivo: imágenes más precisas y la posterior identificación del instante de captura asociado a la variación de agitación que se observa en el registro de datos.

Para ilustrar los resultados se recurre a la curva de evolución de pH, que se complementa con una indicación visual en forma de barras verticales que indica el funcionamiento de la bomba dosificadora de ácido (fase de reducir el contenido del tanque a pH 3), y una curva adicional de marcas que identifican el instante de añadir la cápsula y los instantes posteriores de obtención de imágenes.

5.3.1.2 Resultados obtenidos

La Figura 82 muestra los resultados de un ensayo con cápsulas tipo A. La primera marca de color verde claro indica el instante en el que se añade la cápsula. La siguiente marca (en torno al minuto 1) indica el instante de realizar la foto de la Figura 83a. Se aprecia en dicha imagen que la cápsula flota, y la burbuja en el interior de la misma revela que la cápsula está entera.

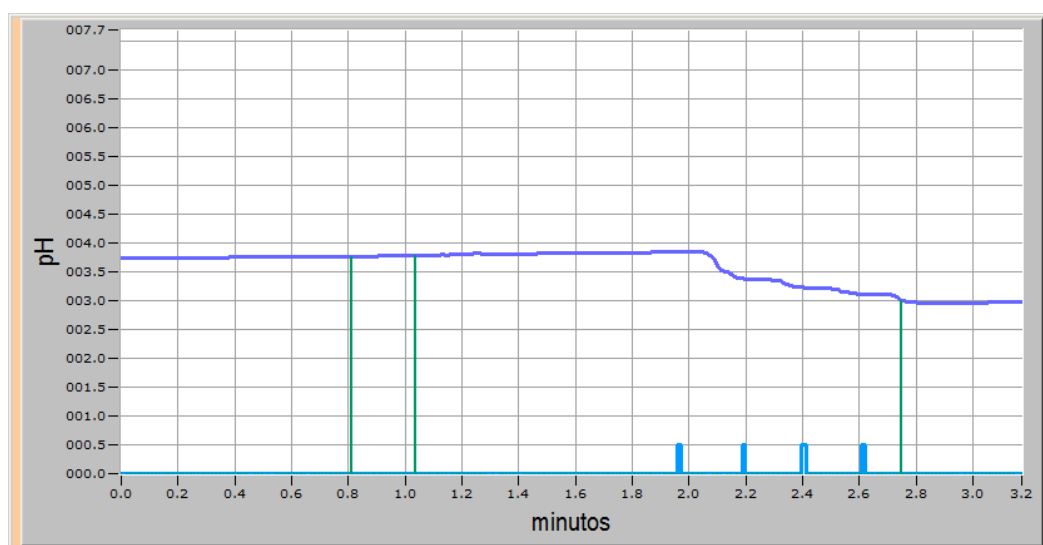


Figura 82 Evolución de pH durante el ensayo con cápsula tipo A

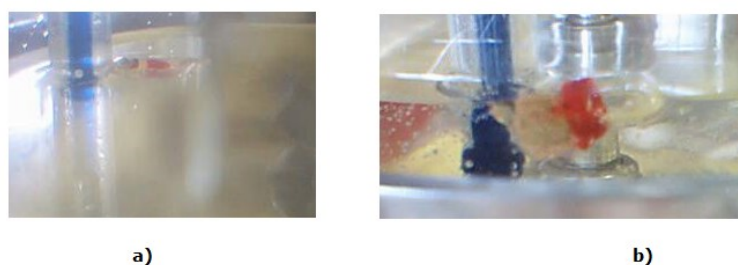


Figura 83 Fotografías de la cápsula A durante el ensayo

La tercera marca verde, poco antes del minuto 2,8, se corresponde con el instante de obtener la imagen mostrada en la Figura 83b. La cápsula se ha roto, y se aprecia porque ha disminuido el volumen de líquido contenido, y porque se observan gotas de aceite en suspensión en el contenido del reactor.

Analizando los resultados se deduce que la liberación del contenido de la cápsula ha coincidido con la dosificación de ácido gástrico simulado. Se ha repetido el ensayo y se ha añadido la cápsula sobre un medio ácido con pH próximo a 3. En la curva correspondiente a la medida de pH que se observa en la Figura 84 se aprecian variaciones de pH debida a la liberación del contenido de la cápsula y su posterior disolución en el contenido del reactor.

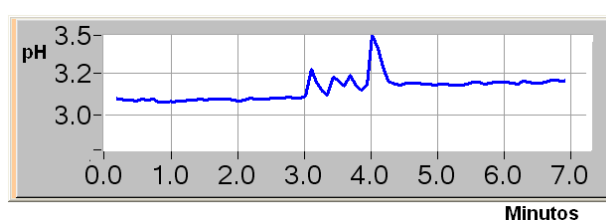


Figura 84 Evolución parcial de pH durante un segundo ensayo con cápsula tipo A

La Figura 85 muestra la evolución de la medida de pH registrada durante un ensayo con una cápsula tipo B.

La primera marca (color verde, posterior al minuto 2) se corresponde con el instante en el que se añade el encapsulado al reactor. Se observa que la cápsula se hunde.

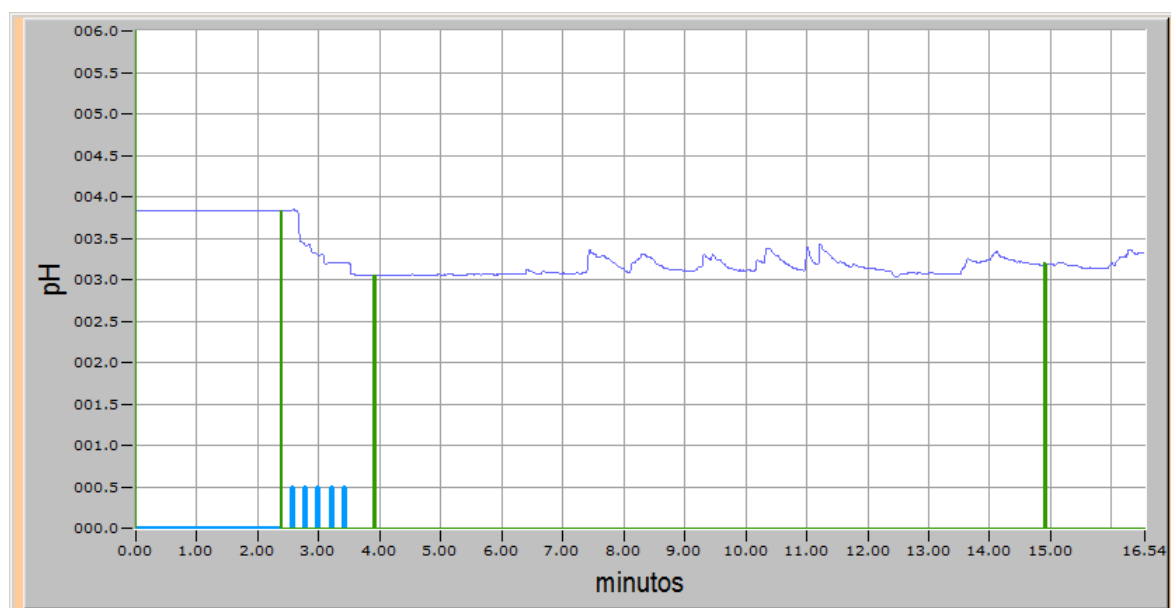


Figura 85 Evolución de pH durante el ensayo con cápsula tipo B

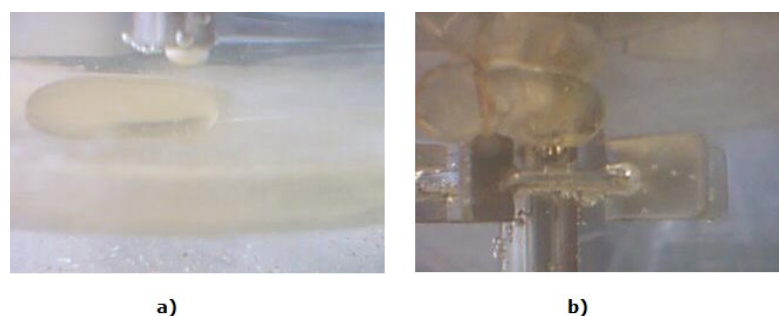


Figura 86 Fotografías de la cápsula B durante el ensayo

La siguiente marca, justo antes del minuto 4, se corresponde con el instante de adquirir la imagen de la Figura 86a. Después de un par de minutos siendo agitada, la cápsula se ha deformado ligeramente. A partir del minuto 7 la cápsula se desplaza a la superficie (flota) y se observan variaciones bruscas en la medida de pH que coinciden con el roce de la cápsula con el electrodo de pH. Hasta este momento, la cápsula también había rozado el electrodo pero no se aprecian estas variaciones tan bruscas. Esto unido a que se aprecian diminutas gotas de aceite en suspensión, se deduce que la cápsula está liberando su contenido, aunque lo hace de forma gradual. A partir del minuto 13 se observa una pérdida de consistencia en el encapsulado. La marca próxima al minuto 15 se corresponde con la imagen mostrada en la Figura 86b.

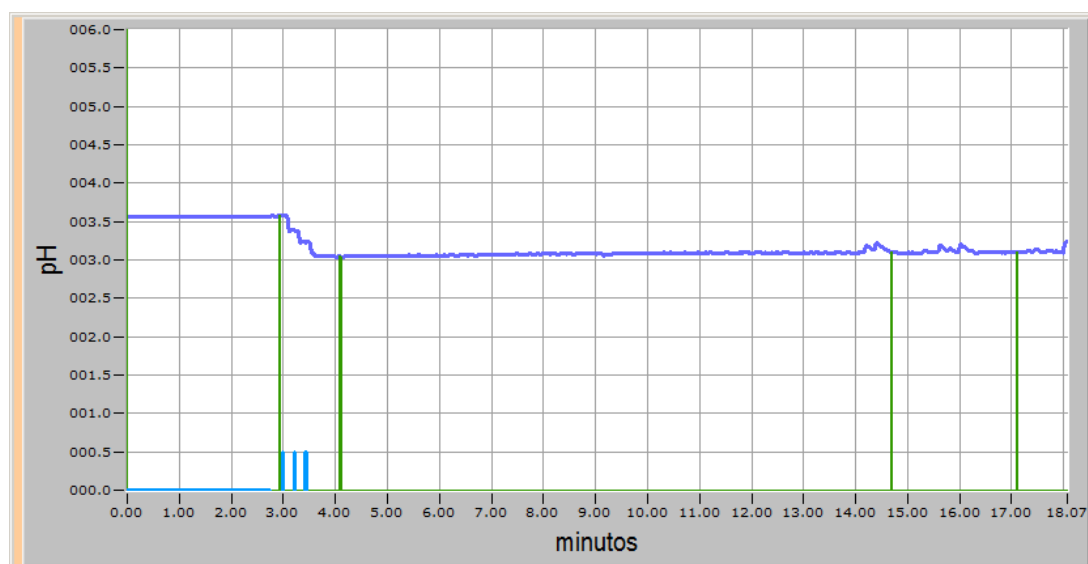


Figura 87 Evolución de pH durante el ensayo con cápsula tipo C

La Figura 87 se corresponde con un ensayo realizado con una cápsula tipo C, que ha sido añadida al reactor en el minuto 3 (primera marca de color verde) y

en el minuto 4 (segunda marca) se ha obtenido la imagen mostrada en la Figura 88a. Se aprecia que la pastilla se hunde hasta el fondo del recipiente.

A partir del minuto 14 se aprecia que la cápsula se aproxima a la línea de flotación. Se observan variaciones de pH que coinciden con la aparición de las primeras gotitas de aspecto oleaginoso en suspensión. La marca del minuto 17 coincide con la obtención de la imagen mostrada en la Figura 88b. La cápsula flota y ha perdido consistencia, a la vez que se ven gotas de aceite en suspensión.

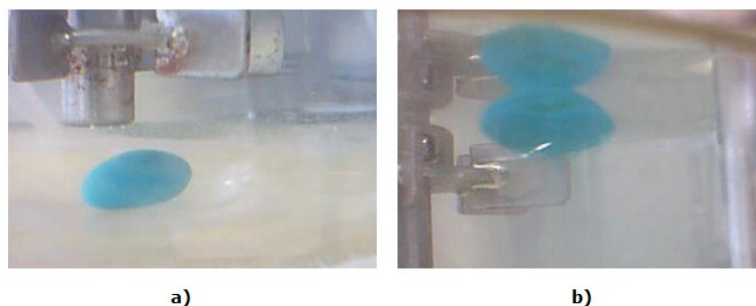


Figura 88 Fotografías de la cápsula C durante el ensayo

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La cápsula tipo A apenas tarda un par de minutos en deshacerse y liberar todo su contenido en cuanto llega al estómago. El fabricante del encapsulado debe replantearse la mezcla de gelatinas empleada pues tiene un tiempo de liberación muy corto.

La cápsula tipo B comienza a liberar su contenido de forma paulatina transcurridos 5 min después de su ingesta y tarda algo más de 7 min en liberar su contenido por completo.

Una vez ingerida, la cápsula tipo C tarda algo más de 10 min en comenzar a liberar lentamente su contenido.

Además de por la inspección visual, la validación de estos resultados se podría confirmar con el correspondiente análisis mediante cromatografía de gases de alta resolución (GPC) de muestras extraídas. En cualquier caso, el ensayo confirma que el sistema es válido para evaluar el punto de liberación de compuestos de interés recubiertos con cápsulas blandas. Este prototipo simulador aporta soluciones simples, de rápida ejecución y eficaces para que un fabricante de encapsulados pueda testar sus productos. Otra conclusión que resulta interesante es que el seguimiento de la medida de pH puede ser usado como indicador de la liberación de principios activos encapsulados en cápsulas de glicerina.

5.3.2 ENSAYOS CON EMULSIONES ALIMENTARIAS.

5.3.2.1 Emulsiones múltiples y alimentos funcionales

Se han elaborado emulsiones dobles con fines alimentarios en las instalaciones del Departamento de Ingeniería Química asignadas al grupo de investigación de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos. Estas emulsiones, como parte de su caracterización, han sido objeto de estudio durante este trabajo de investigación.

Las emulsiones múltiples, también denominadas emulsiones dobles, son sistemas multicompartimentalizados, caracterizados por la coexistencia de emulsiones de aceite-en-agua (*oil in water, O/W*) y de agua-en-aceite (*water in oil, W/O*), en las que glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas más pequeñas, igualmente dispersas. Son, en resumen, “emulsiones de emulsiones”.

Las más comunes son las de agua-en-aceite-en agua (*W/O/W*), aunque también se usan las de aceite-en-agua-en-aceite (*O/W/O*) en aplicaciones específicas (Shuch, 2013).

La aplicación de emulsiones múltiples abre nuevas posibilidades en el diseño y desarrollo de alimentos funcionales (Jiménez-colmenero, 2013).

La Acción Concertada de la Comisión Europea sobre la Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (*Functional Food Science Europe, FUFUSE*) utiliza la siguiente definición para alimentos funcionales (según interpreta F. Jiménez Comenero): “Un alimento puede ser considerado funcional si, más allá de su valor nutricional habitual, ha demostrado satisfactoriamente tener un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo en una forma que resulta apropiada para mejorar el estado de salud y bienestar y/o para la reducción de riesgo de enfermedad”.

El desarrollo de este tipo de alimentos funcionales pasa por emplear estrategias que condicionan la presencia de determinados ingredientes funcionales (principios activos), bien incrementando la proporción de aquellos que presentan efectos beneficiosos, o bien limitando el contenido de los ingredientes con implicaciones negativas para la salud.

En este contexto, el empleo de emulsiones múltiples ofrece grandes expectativas.

5.3.2.2 Emulsiones W/O/W

Las emulsiones (W1/O/W2) están constituidas por tres fases (Figura 89). Dos acuosas, una interior y otra exterior generalmente de distinta composición, y una lipídica localizada entre ellas. Las fases están separadas entre sí por dos tipos de interfases estabilizadas mediante surfactantes, uno hidrofóbico

designado para estabilizar la interfase de la emulsión interna W/O y uno hidrofílico para la interfase interna de los glóbulos de grasa.

La formación de emulsiones múltiples transcurre generalmente a través de dos procesos de emulsificación, por ser éste el procedimiento más adecuado para obtener sistemas estables de composición bien definida y distribución del tamaño de partícula reproducible. En una primera fase se forma una emulsión de agua-en-aceite (W1/O) mediante homogenización de una fase acuosa (W1) y otra lipídica (O), en presencia de un emulsificador lipofílico capaz de producir la interfase W1-O. En una segunda etapa se procede a la homogenización de la emulsión W1/O con una nueva fase acuosa (W2) con la ayuda de un emulsificador hidrofílico (interfase O-W2), obteniéndose así la doble emulsión (W1/O/W2) (Jiménez-colmenero, 2013).

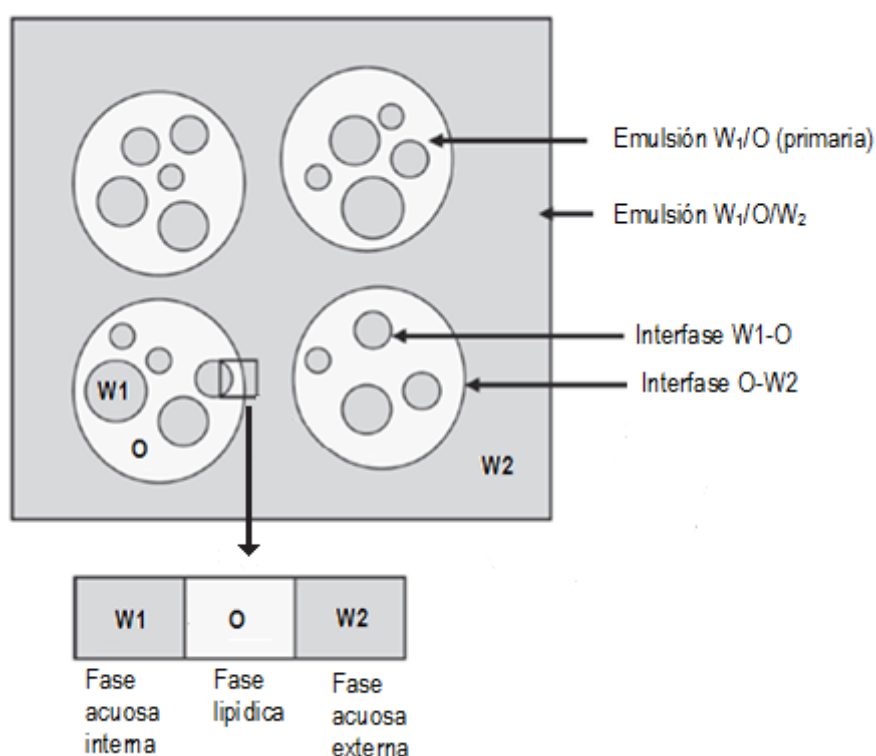


Figura 89 Emulsión W/O/W

La emulsión primaria (W1/O) se prepara empleando condiciones de homogenización más enérgicas que la segunda. Así, la aplicación de procesos de homogenización más suaves evita la rotura de los glóbulos internos (McClements, 2010). La Figura 90 resume de forma esquemática el proceso de preparación.

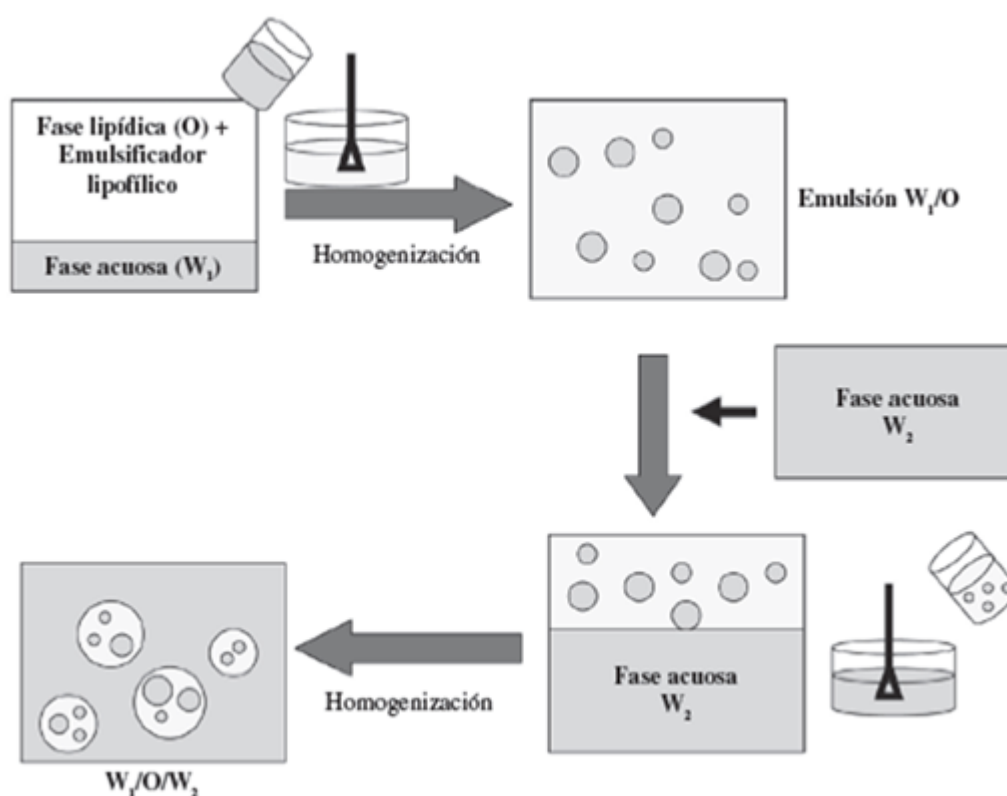


Figura 90 Preparación de emulsión doble $W/O/W$

Los compuestos bioactivos se pueden integrar en varias localizaciones y en distintas condiciones ambientales. Los compuestos solubles en agua (minerales, vitaminas, aminoácidos, péptidos, fibras, etc.) pueden ser incorporados tanto en la fase acuosa interna (W_1) como externa (W_2), con antelación a la aplicación de los procesos de homogenización.

En la segunda etapa de homogenización se incorporan los compuestos liposolubles (ácidos grasos, carotenoides, antioxidantes, vitaminas, etc.) en la fase lipídica. En el caso de las emulsiones objeto de estudio en este trabajo se incorporan ácidos grasos Omega-3.

Los ingredientes funcionales con actividad superficial se pueden integrar en las interfaces W_1-O y $O-W_2$.

Los ingredientes bioactivos hidrofílicos presentes en la fase interna (W_1) se encuentran atrapados en el interior de micro o nanocápsulas que limitan el efecto de atributos sensoriales indeseados de los mismos. Por el contrario, los ingredientes bioactivos hidrofílicos presentes en la fase externa (W_2) se potencian para que exhiban propiedades más agradables (sabor y olor, principalmente), favoreciendo así la ingesta de estos alimentos.

5.3.2.3 Descripción del ensayo

Se ha simulado la digestión de una emulsión doble que contiene ácido eicosapentanoico, EPA, elaborada según el método descrito anteriormente. El objeto de esta emulsión es combatir el colesterol, entre otras aplicaciones. La emulsión tiene una densidad de 0,9769 g/mL. El objetivo del ensayo es doble, por una parte evaluar la biodisponibilidad de EPA, a la vez de contribuir a la caracterización de dicho preparado.

Para simular la fase de digestión gástrica se parte de un reactor que contiene 700 mL de medio ácido formado por agua desionizada a la que se ha añadido HCl hasta obtener un valor de pH 3. A este medio ácido que simula el estómago vacío se añade 30.74 g de emulsión. Como consecuencia el nivel de pH del contenido del reactor se incrementa. Se añade 0,3 mL/min de HCl 1M hasta alcanzar de nuevo pH 3. Mientras tanto, el tanque se agita a 70 rpm y la temperatura se regula en $36,6 \pm 1$ °C.

Después de unos minutos se procede a simular el paso por el duodeno, mediante la adición de 4,5 mL/min de NaHCO_3 1M hasta alcanzar pH 6. Cuando se supera pH 5 se adiciona 4mL/min de una disolución que contiene agua destilada y sales biliares diluidas a 0,4g/mL. La dosificación de sales biliares concluye cuando se alcanza el 4% del volumen del reactor. Transcurridos 15 min desde el inicio de la simulación duodenal se extrae una muestra del reactor.



Figura 91 Ensayo con emulsión alimentaria: Reactor y emulsión original

La siguiente etapa es la simulación de la absorción intestinal. Para ello se emplea una membrana de 0,2 μm de tamaño de corte molecular y se activan las bombas de dilución y retorno con caudales de 27 mL/min y 18 mL/min, respectivamente. Con estos caudales se miden variaciones promedio de presión

de 45 mmHg en el circuito hidráulico que simula el intestino y se obtiene un ritmo de salida de producto filtrado de 1,47 mL/min. Transcurridos 20 min del inicio de la fase de dilución se recoge una segunda muestra, esta vez de producto filtrado, para su análisis.

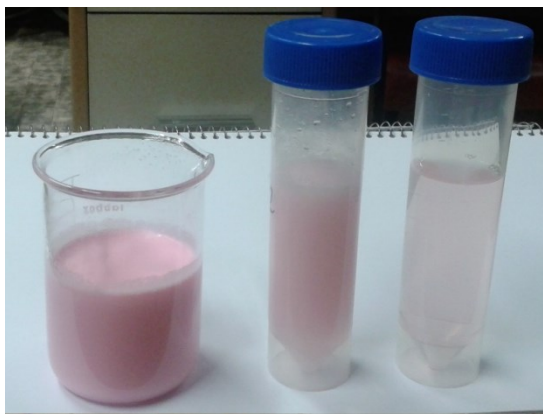


Figura 92 Emulsión original, muestra "digerida" y muestra filtrada

5.3.2.4 Análisis químico

En el Anexo V se adjunta informe con referencia 14-1289-01 realizado por un laboratorio externo. Según dicho informe, el análisis por gravimetría realizado sobre la emulsión original indica un 27,69% de grasa bruta y el análisis cuantitativo de ácidos grasos en el aceite, obtenido por cromatografía de gases, indica 699 mg/g de EPA.

El contenido del reactor es la suma de agua, ácido usado para simular jugos gástricos, base usada para simular jugos pancreáticos, sales biliares y emulsión. La suma de estos productos resulta 830 g.

El contenido teórico de grasa en el reactor, sería:

$$30,74g_{EMULSIÓN} \times 27,69\% = 8,51g \rightarrow 8,51 \times \frac{100}{830g_{TotalReactor}} = 1,025\% \quad (22)$$

Por tanto, la cantidad teórica de EPA en el reactor es de 5,95 gramos.

$$EPA_{TEORICO} = 699 \frac{mg_{EPA}}{g_{GRASA}} \times 8,51g_{GRASA} = 5,95g \quad (23)$$

Se ha analizado la muestra obtenida tras la fase de simulación duodenal (informe 14-1291-01 del Anexo V). El método de gravimetría determina un 0,60% de grasa, y por cromatografía de gases se obtiene un valor de riqueza de EPA de 250,4 mg/g.

$$EPA = (830g_{REACTOR} \times 0,60\%) \times 250,4 \frac{mg_{EPA}}{g} = 1,25g \quad (24)$$

Con estos resultados se deduce que hay un 79,27% de EPA que no está bio-disponible tras la digestión del preparado inicial.

Existen antecedentes del uso de membranas para filtrar EPA en medios acuosos (patente *WO 2010143974 A1, Miljo, 2010*), usando módulos de tamaño de poro entre 0,1 y 10 μm y presiones muy superiores (del orden de 800 mbar). Aun así se ha ensayado la absorción usando una membrana de tamaño de corte de 0,2 μm y baja presión, en torno a los 50 mmHg, simulando las condiciones reales del intestino en condiciones normales. No se han obtenido datos relevantes en cuanto a presencia de ácido eicosapentanoico en el producto filtrado.

5.3.3 ENSAYOS CON COLORANTES.

Se han realizado algunas pruebas con colorantes. Este tipo de compuestos se pueden usar como sustancias guías. Además de usarse en determinadas aplicaciones como marcadores de liberación, se emplean como referencia para el estudio de compuestos de pesos moleculares similares.

Para este tipo de pruebas se prepara una serie de diluciones de concentraciones conocidas del compuesto que contiene el colorante, usadas como elementos patrón. La medida de absorbancia realizada con un espectrofotómetro de esta serie de patrones permite obtener un conjunto de puntos en una gráfica que relaciona medias de absorbancia y concentración. El uso de una adecuada función de linealización de estos puntos permite trazar una recta de calibración. Durante la fase de simulación de la absorción intestinal se obtienen muestras de producto filtrado que son analizadas en el espectrofotómetro. El valor de absorbancia obtenido se compara con la recta de calibración indicada anteriormente, obteniéndose el valor extrapolado de concentración de la muestra objeto de estudio.

OBTENCIÓN DE LA RECTA DE CALIBRACIÓN

Se ha aplicado el nombre genérico de *InterpolaPuntos* al programa que se ha desarrollado para obtener la recta de calibración. Para ello se ha hecho uso de las librerías gráficas y matemáticas que incorpora el entorno de programación *CVI*.

La Figura 93 muestra el aspecto de la interfaz de usuario de dicho programa. Dispone de dos entradas numéricas para introducir las coordenadas *X* (valor de absorbancia) e *Y* (porcentaje de dilución). Cada vez que se introduce un par de coordenadas se acciona el control “*dibuja punto*” (1) que guarda los datos en memoria y muestra el punto en la gráfica, en el color determinado por el *selector de colores* (5). Una vez introducidos todos los valores, el control (2) “*Calcula Recta*” ejecuta la función de linealización, dibuja la recta en pantalla y muestra en el panel (3) la ecuación lineal que relaciona los valores introducidos y el error cuadrático medio. Introduciendo ahora un valor nuevo en la entrada

numérica (4) el programa devuelve el porcentaje de dilución que le corresponde a dicho valor.

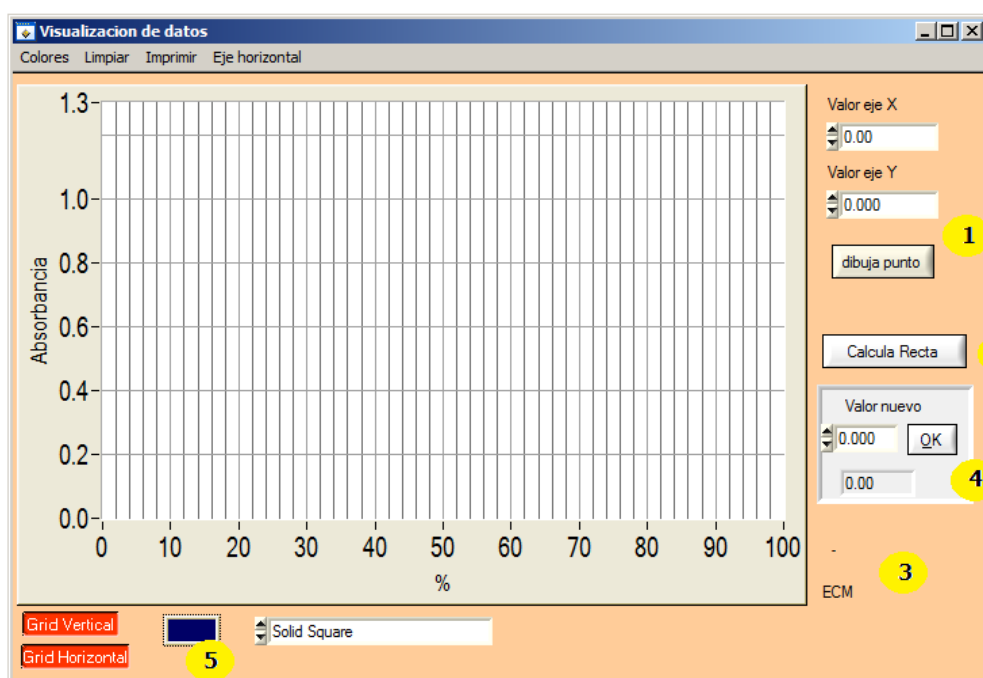


Figura 93 Interfaz de usuario del programa Interpolapuntos

La librería de funciones matemáticas del entorno de programación ofrece soluciones para calcular los valores de pendiente (parámetros) y cruce por cero (parámetro b) que definen la recta conformada por una serie de puntos. El algoritmo de linealización usado se basa en el método de mínimos cuadrados.

$$ECM = \frac{\sum_{i=0}^{n-1} |Z_i - Y_i|^2}{n} \quad (25)$$

La ecuación (18) expresa cómo se ha obtenido el valor cuadrático medio (ECM) a partir de los valores Y_i introducidos y de los valores Z_i resultantes de la linealización

$$Z_i = s \times X_i + b \quad (26)$$

5.3.3.1 Ensayo con ácido carmínico

Se experimenta con un preparado de agua desionizada que contiene 0,028/100 g/mL de ácido carmínico. Se utiliza esta concentración por ser un éste el valor empleado en la preparación de la emulsión alimentaria descrita anteriormente en el apartado 5.3.2.

Se han realizado medidas en el espectrofotómetro y se ha comprobado que presenta un máximo para el haz de luz de longitud de onda de 325 nm. Se ha llevado a cabo una serie de diluciones de dicha mezcla y se ha medido en el espectrofotómetro la absorbancia para una longitud de onda indicada, obteniéndose los valores indicados en la Tabla 9.

%	A
10	0,279
20	0,344
30	0,45
40	0,535
50	0,626
60	0,728
70	0,788
80	0,885
90	0,984

Tabla 9 Valores de la recta de calibración del ácido carmínico

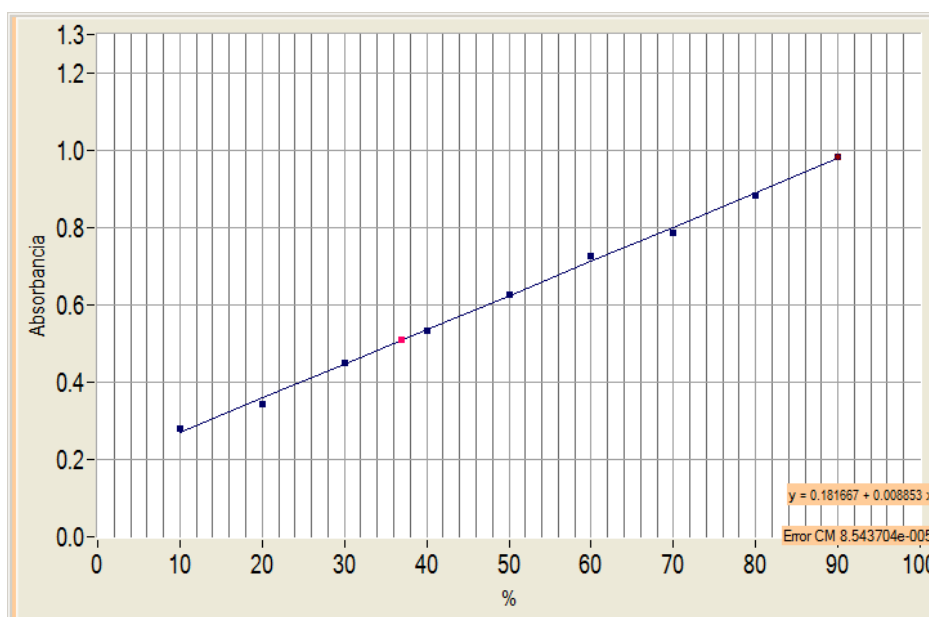


Figura 94 Recta de calibración del ácido carmínico (concentración 28mg/100mL)

Del ensayo descrito anteriormente en el apartado 5.3.2.3 se realizó la medida de absorbancia de muestra de producto filtrado para longitud de onda λ , de 325 nm, obteniéndose un valor de 0,509 A.

En la Figura 94 se observa la recta obtenida y la interpolación (punto en color rosa) del valor de 0,509 A que le corresponde una concentración de 36,97%.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Este ensayo complementa al ensayo descrito en el apartado 5.3.2.3 y permite determinar que hay un 63,03% de emulsión que no se absorbe.

Los mecanismos fisiológicos relacionados con la absorción de alimentos en el intestino delgado son muy complejos y difíciles de simular en su totalidad. La simulación *in vitro* ofrece resultados aproximados, útiles sobre todo para comparar resultados. A tenor del resultado obtenido al comparar la absorbancia del producto filtrado con una recta de calibración, sería incorrecto determinar un valor de biodisponibilidad para la emulsión alimenticia ensayada, pues hay muchos parámetros que no se han contemplado. Sí es más acertado afirmar que al menos hay una cantidad que no es biodisponible.

Esta Tesis Doctoral ofrece al investigador que desarrolla emulsiones alimentarias un conjunto de herramientas que permiten obtener fácilmente valores aproximados de biodisponibilidad. Con estos resultados el investigador puede estimar oportuno o no modificar la formulación del compuesto, en cuyo caso dispone de un instrumento útil para comparar la eficacia de las diversas formulaciones de un mismo producto.

5.3.4 ENSAYOS CON NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

5.3.4.1 Preparación de Nanopartículas Lipídicas

El Grupo de investigación de Síntesis Orgánica y Nanotecnología de la Universidad de Málaga tiene experiencia en el encapsulado de principios activos en forma de nanopartículas lipídicas (*NPLs*). La elaboración de los formulados de *NPLs* empleados en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga siguiendo el método de ultra-agitación, el cual está basado en técnicas previamente descritas por Mulle (2000) y Radtke (2005).

Está probado que la encapsulación en forma de nanopartículas lipídicas protege principios activos inestables química o biológicamente contra la degradación, potenciando su eficacia. También favorece el transporte y la manipulación de fármacos que en otras condiciones no serían solubles en agua o presentarían efectos secundarios irritantes.

Para preparar las *NPLs* se agrega el compuesto activo a la matriz lipídica, la cual debe estar previamente fundida a una temperatura entre 5 y 10 °C por encima de su punto de fusión. Para la homogeneización, la matriz lipídica fundida que contiene el principio activo se dispersa mediante agitación en una disolución acuosa de tensioactivo. Seguidamente todos los componentes, que se encuentran a la misma temperatura, se emulsionan por ultra-agitación utilizando el homogeneizador modelo Silentcrusher-m. De esta forma se obtiene una nanoemulsión caliente. Al enfriarse a temperatura ambiente cristalizan los lípidos produciéndose nanopartículas lipídicas sólidas que se encuentran en emulsión acuosa.

PREPARACIÓN DE NPLs DE MACELIGNANO.

Se introduce 0,6 g de Lípido-E en un matraz Erlenmeyer y se calienta (80 °C) en un baño de aceite hasta que el lípido se encuentra fundido. A continuación se añade 0,3 g de PC y 5,47 mL de agua, se calienta a la misma temperatura y se agita mediante agitación magnética. Una vez fundida la mezcla se añade 0,95 mL de Tween® 80 y 0,13 mL de n-butanol. Tras 5 min de agitación se añade 75 mg de macelignano y 7,4 mL de agua. Esta mezcla se ultra-agita a 8000 rpm durante 15 m con homogeneizador dispersador. Posteriormente se deja reposar el Erlenmeyer en frío durante 24 horas tapado con papel de parafina. Tras 24 h se filtra al vacío.

PREPARACIÓN NPLs DE TAXOL®.

Se introduce 0,3 g de Lípido E en un matraz Erlenmeyer y se calienta a 80 °C mediante un baño de aceite hasta que se funda la mezcla. Se añade 0,15 g de PC y 6 mL de suero fisiológico, se calienta a la misma temperatura y se agita mediante agitación magnética. Cuando la mezcla se encuentra fundida se añade 0,4237 mL de Tween® 80 y 0,085 mL de n-butanol. Tras 5 min agitando se añade 3,3 mg de Taxol® y 7,5 mL de suero fisiológico, hasta completar los 15 mL de mezcla. Esta mezcla se ultra-agita a 8000 rpm durante 15 min y posteriormente se deja reposar en frío durante 24 h, tapando el Erlenmeyer con papel de parafina. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtra a vacío.

5.3.4.2 Ensayo con macelignano

Se añaden 390 mg de macelignano a un reactor agitado que contiene 700 mL de medio ácido, con nivel de pH 2,5, formado por agua desionizada y HCl. Durante todo el proceso de simulación el reactor se mantiene a $36,6 \pm 1$ °C y la turbina que agita su contenido gira a 70 rpm. Transcurridos 30 min se simula el paso al

duodeno dosificando 4,5 mL/min de NaHCO_3 1M hasta alcanzar pH 6. En total se agrega 23,75 mL de base. La siguiente etapa es dosificar 29,75 mL de una disolución que contiene un 0,04% de sales biliares, con un caudal de 4 mL/min. La fase de simulación de absorción intestinal ha consistido en extraer el contenido del reactor de tanque agitado e impulsarlo al sistema tubular de filtración que contiene una membrana de 0,2 μm de tamaño de corte molecular. Para ello se ha usado una bomba peristáltica configurada para mover un caudal de 27 mL/min. El producto no filtrado se hace retornar del sistema de filtración al tanque agitado mediante una bomba peristáltica configurada para mover un caudal de 18 mL/min.

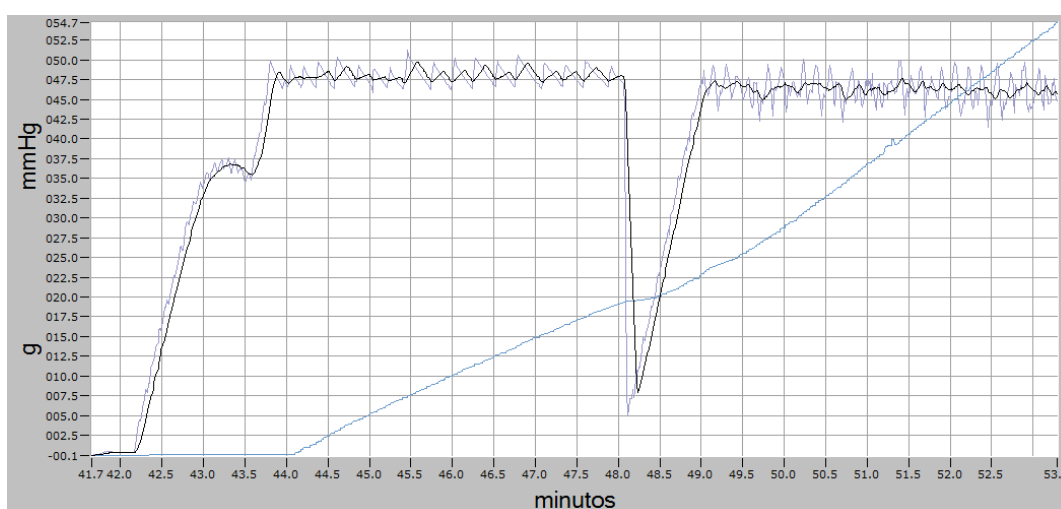


Figura 95 Simulación de digestión de macelignano. Fase de absorción intestinal

La Figura 95 muestra la evolución del peso de producto filtrado (traza azul) y las variaciones de presión medidas (la traza negra se corresponde con los valores promediados).

En el minuto 48 se detiene momentáneamente la fase de dilución para poder acomodar el recipiente donde se recoge una muestra del producto filtrado.

Todo el ensayo se repite posteriormente, para simular la ingesta de macelignano encapsulado en formato de nanopartículas lipídicas.

Para este segundo ensayo, se añade 1,03 g de *NPLs* que contienen macelignano a un reactor agitado con 700 mL de medio ácido, pH 2,65, formado por agua desionizada y HCl y que simula el estómago vacío.

Durante todo el proceso de simulación el reactor se mantiene a $36,6 \pm 1$ °C y la turbina que agita su contenido gira a 60 rpm.

El paso por el duodeno (Figura 96) se simula añadiendo 4,5 mL/min de NaHCO_3 hasta alcanzar pH 6 (simulando la secreción de jugos pancreáticos). De forma paralela, cuando el valor de pH sube de 5 se adicionan 5 mL/min de sales biliares

diluidas en agua desionizada al 0,4%, hasta alcanzar un 4% del volumen del reactor.

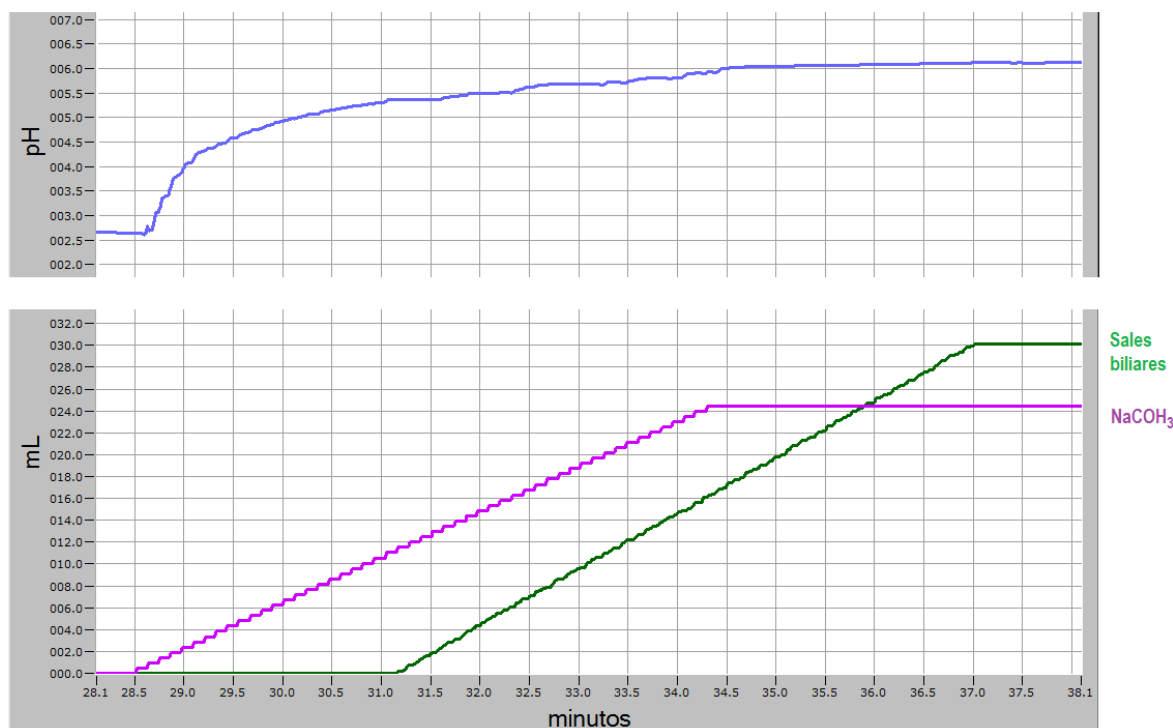


Figura 96 Simulación de digestión de NPLs de macelignano

Transcurrida esta fase, se da paso a la siguiente etapa consistente en simular la absorción intestinal.

Al igual que en el ensayo anterior, la fase de simulación de absorción intestinal ha consistido en extraer el contenido del reactor de tanque agitado e impulsarlo al sistema tubular de filtración que contiene una membrana de 0,2 μm de tamaño de corte molecular, usando una bomba peristáltica configurada para mover un caudal de 27 mL/min. El producto no filtrado se hace retornar del sistema de filtración al tanque agitado mediante una bomba peristáltica configurada para mover un caudal de 18 mL/min.

Transcurridos 20 min del inicio de la etapa que simula la absorción intestinal, se acopla un recipiente en la salida de producto filtrado para obtener una muestra para su posterior análisis.

ANÁLISIS QUÍMICO.

Las muestras obtenidas han sido analizadas por espectrometría de masas. La Figura 97 muestra el espectro de alta resolución resultante de analizar una muestra de NPL que contiene macelignano. Se utiliza como patrón una muestra del producto de macelignano puro, el cual es un sólido y se

analiza disuelto en metanol. De esta forma se obtiene el espectro del producto, que sirve como referencia.

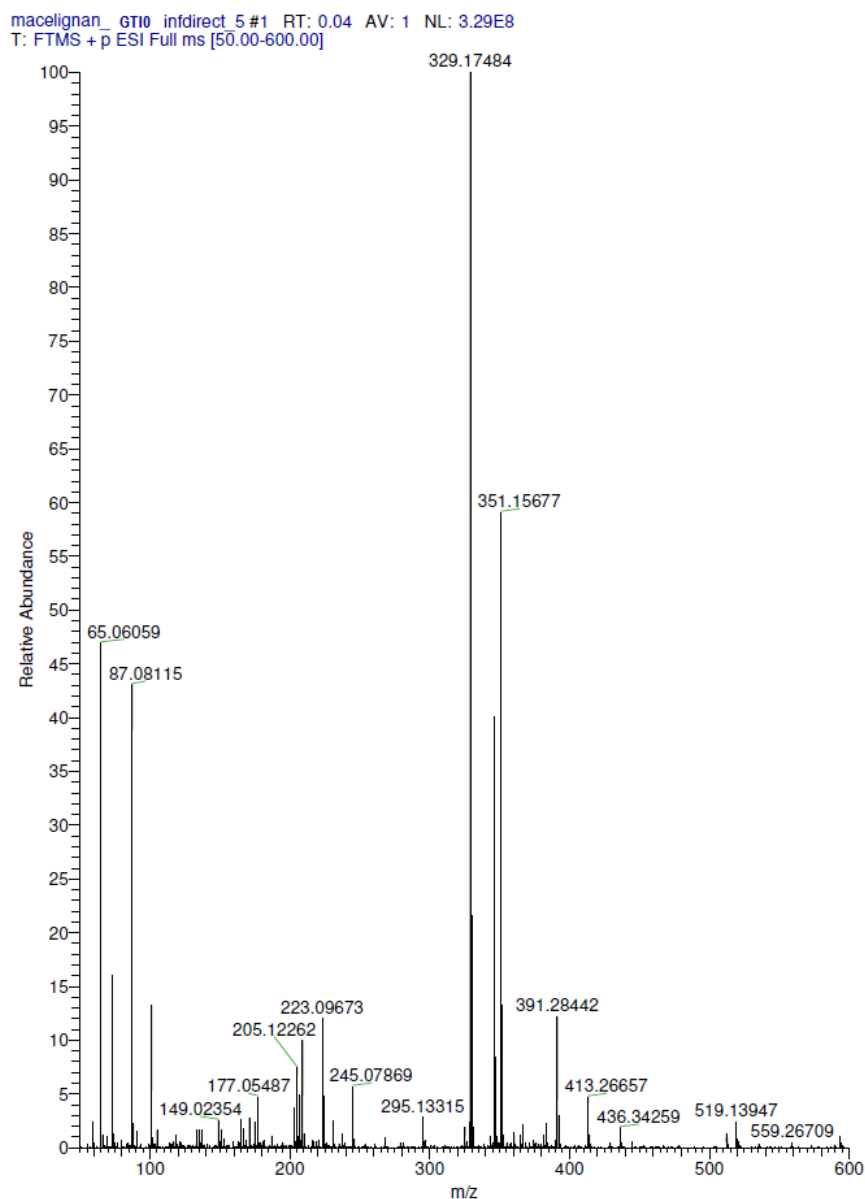


Figura 97 Espectro de macelignano obtenido mediante HESI-MS

Las muestras resultantes del ensayo de digestión se analizan en emulsión en agua. El análisis HESI-MS tiene como característica el que fragmenta poco las moléculas orgánicas y por ello está indicado para detectar la masa molecular del producto analizado. La ionización provoca la creación de aductos del tipo *molécula+protón* o del tipo *molécula+agua*, que se reflejan en picos de masas $M+1$ o $M+18$, respectivamente.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En el espectro de la Figura 97 se observa claramente el pico de 329 m/z que identifica al macelignano. En el análisis de las muestras tomadas durante los ensayos predominan picos propios de sustancias contenidas en el agua y reactivos usados para simular los fluidos gástricos durante el proceso de digestión. El listado de masas ofrece una información más detallada del análisis de las muestras de producto filtrado.

Macelignano_digerido_08102014_infdirectESI_pos#1 RT:
0.03

T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-600.00]

m/z	Intensity	Relative
326,96	58159,0	0,04
327,07	52769,6	0,03
329,21	50684,5	0,03
331,19	50708,2	0,03
343,12	63828,9	0,04
345,20	55298,0	0,03
347,09	483250,3	0,30
347,18	50032,8	0,03
348,99	191093,0	0,12
350,24	149352,0	0,09
350,99	142850,2	0,09
351,07	200581,0	0,12
351,09	245512,3	0,15
351,24	1614821,5	0,99
351,25	1590463,3	0,98
351,75	828069,6	0,51
351,75	441566,0	0,27
352,24	191512,3	0,12

Tabla 10 Extracto del listado de masas HESI-MS de la muestra de macelignano (producto filtrado tras simulación gastrointestinal)

La Tabla 10 muestra un extracto del listado de masas obtenido a partir de la muestra de macelignano digerido y filtrado. La Tabla 11 muestra un extracto del listado de masas correspondiente al análisis de la muestra de NPLs con macelignano digeridas y filtradas. En ambos listados se han seleccionado los valores de masas próximos a los picos más representativos de la Figura 97.

macelignan_GIT1Fsacnpos_indirect#1 RT: 0.03
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-400.00]

m/z	Intensity	Relative
327,98	171274,8	0,04
328,23	3254019,3	0,72
329,23	694002,1	0,15
329,74	191480,3	0,04
330,14	163681,5	0,04
345,83	242958	0,05
345,96	132638,1	0,03
346,07	513005,6	0,11
346,24	13038872	2,88
347,07	690569,1	0,15
350,25	139359,6	0,03
350,91	175021,9	0,04
351,19	9312575	2,06
352,04	168291,7	0,04

Tabla 11 Extracto del listado de masas HESI-MS de la muestra de NPLs de macelignano (producto filtrado tras simulación gastrointestinal)

En la Tabla 11 se observa una mayor abundancia relativa en los picos de masa 329 y 346 m/z, correspondientes, respectivamente, a los aductos *masa+H* y *masa+H₂O* de macelignano.

Se aprecian picos que confirman la presencia de macelignano en el producto filtrado de NPLs digeridas. Por ello se puede concluir con la realización de este ensayo cualitativo que el macelignano nanoencapsulado resiste la digestión, pudiendo ser absorbido en el intestino. La nanoencapsulación del macelignano facilita su bio-disponibilidad.

5.3.4.3 Ensayo con Taxol®

Se ha realizado un ensayo similar al anterior utilizando NPLs de Taxol®. El ensayo se ha llevado a cabo en idénticas condiciones y siguiendo los mismos pasos, pero sustituyendo macelignano por Taxol®. El compuesto ensayado se prepara conteniendo 4 mg de Taxol® en 5 mL de emulsión de NPLs.

Del mismo modo que en el ensayo con macelignano, se han obtenido dos muestras: una directamente del contenido del tanque, una vez completadas las fases de simulación gastro-duodenal y otra muestra se ha obtenido de la salida del

sistema de filtración. Se ha usado igualmente una membrana cerámica de 0,2 μ de corte molecular.

RESULTADOS OBTENIDOS.

Las muestras obtenidas han sido analizadas por *ESI-MS*. Previamente las muestras han sido extraídas con diclorometano y una vez evaporado el disolvente disueltas en metanol.

En la búsqueda del *paclitaxel* se esperaba observar los iones 854 (correspondiente a $M+H^+$), 876 (correspondiente a $M+Na^+$), ó 871 (que se corresponde con $M+NH_4^+$). En ningún caso se han observado estos iones, tanto en polaridad positiva como en polaridad negativa.

Se deduce por consiguiente que no hay presencia del principio activo en las muestras analizadas. Una primera conclusión es que el Taxol® (*paclitaxel*) no supera la digestión gastroduodenal, degradándose, por tanto no es biodisponible si se ingiere por vía oral en el formato ensayado.

5.3.4.4 Ensayo con *PS122*

Se ha simulado la ingesta asimismo de *NPLs* que contienen un compuesto activo denominado de forma genérica *PS122*. Este es un compuesto sintético del cual se estudia su actividad antitumoral en el Instituto de Química Médica de Madrid.

Durante el ensayo, el biorreactor contiene 600 mL de medio ácido con pH 3,0, compuesto por agua desionizada y HCl. Se añaden 16,64 g de *NPLs* que contienen *PS122* (volumen aproximado de 24 mL). Durante todo el tiempo que transcurre el ensayo el contenido del biorreactor se mantiene agitado, siendo la velocidad de la turbina 70 rpm, y a temperatura de $36,6 \pm 1$ °C.

Transcurridos 30 min se inicia la dosificación de 4,5 mL/min de $NaHCO_3$ 1M que simula la neutralización del quimo en el duodeno, hasta alcanzar un valor de pH 6,0. La cantidad total dosificada ha sido de 58,8 mL de $NaHCO_3$. La siguiente etapa es la dosificación de 34 mL de dilución compuesta de agua desionizada y 0,4% de sales biliares, a razón de 10 mL/min.

Para simular la fase de absorción intestinal se ha configurado la bomba peristáltica de impulsión para que proporcione un caudal de 27 mL/min, la bomba peristáltica de retorno se ha configurado para 18 mL/min y se utiliza una membrana de tamaño de corte molecular de 0,2 μ m. Tras 18 min se extrae una muestra de producto filtrado para su análisis. Se observa un caudal másico de producto filtrado de 1,46 g/min.

ANÁLISIS QUÍMICO.

El análisis de las muestras obtenidas se ha llevado a cabo por espectrometría de masas DEP-MS.

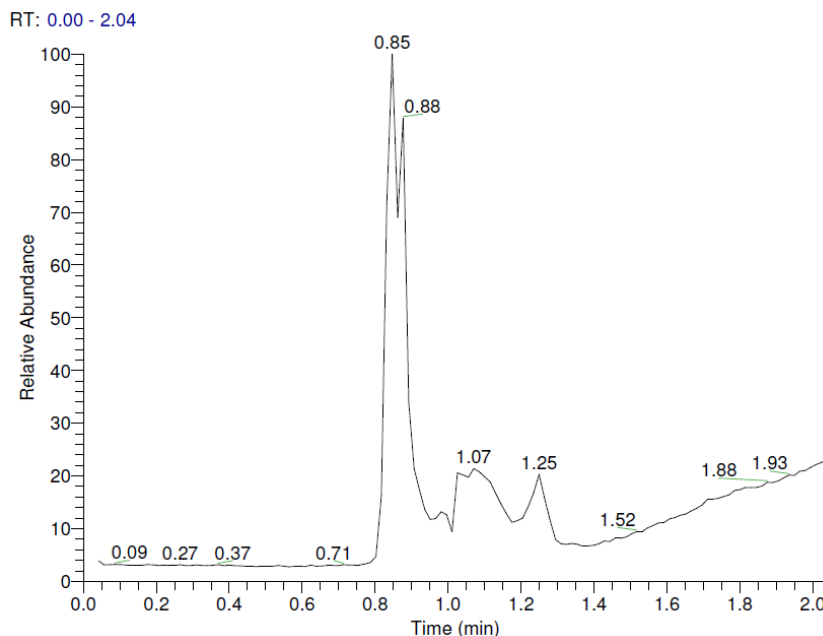


Figura 98 Cromatograma tras análisis DEP-MS del compuesto PS122

El compuesto *PS122* es un sólido que se ha analizado por infusión directa para obtener su espectro de masas. La muestra acuosa de producto filtrado se ha extraído previamente en diclorometano.

La Figura 98 muestra el cromatograma obtenido del análisis de *PS122* por infusión directa y la Figura 99 muestra el espectro de masas correspondiente a la señal observada a un tiempo de 0,85 minutos. Se observa el pico de 384 m/z que identifica la masa molecular del compuesto *PS122*. Esta sirve de referencia para el análisis de las muestras filtradas en el proceso de digestión, las cuales se analizan más adelante.

En el espectro completo de la muestra de producto filtrado predominan los picos correspondientes a los reactivos empleados para simular los fluidos corporales, que se han empleado en mayor cantidad que el compuesto objeto de estudio.

No obstante, se observa en el listado de masas la presencia del pico que identifica la masa de *PS122*. La Tabla 12 se corresponde con un extracto de dicho listado en el que se comprueba la presencia del pico correspondiente a la masa 384 m/z.

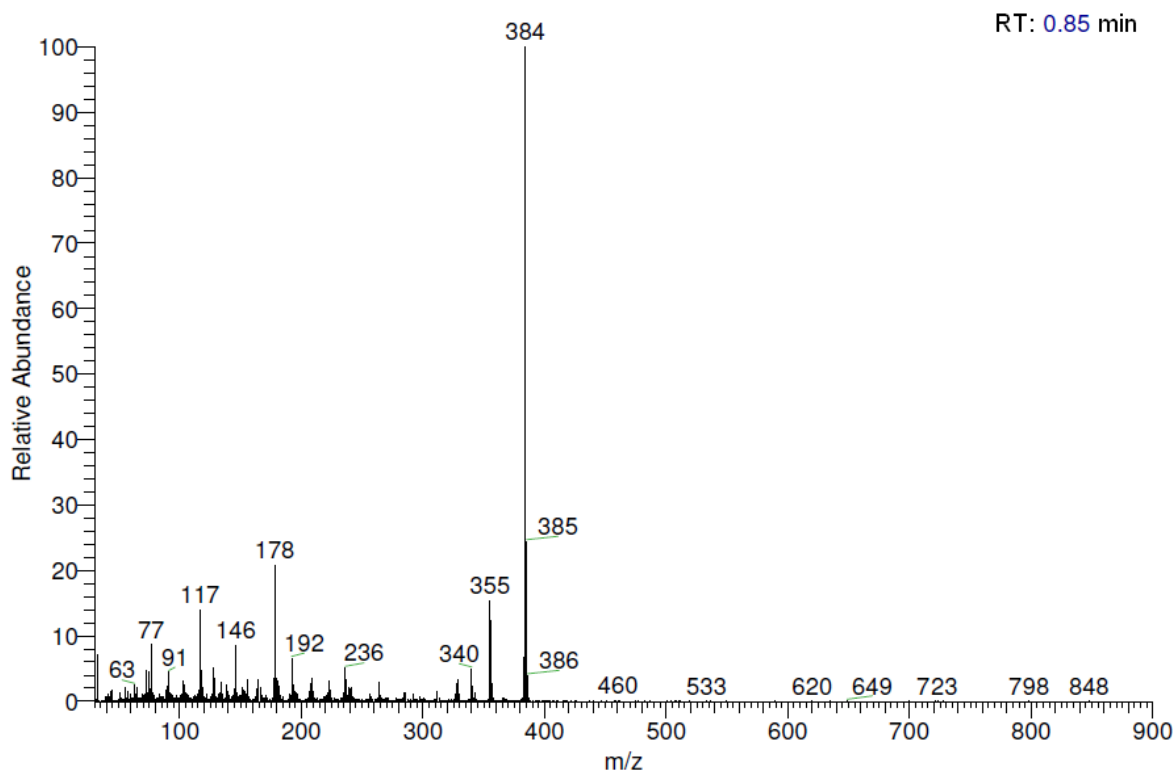


Figura 99 Espectro del compuesto PS122

OR1290_NPS_3 RT: 0.92

T: + c Full ms [30.00-900.00]

m/z	Intensity	Relative
379	3173.0	0.05
380	2761.0	0.04
381	4512.0	0.07
382	28395.0	0.43
383	13774.0	0.21
384	134583.0	2.05
385	37135.0	0.57
386	15854.0	0.24
387	10333.0	0.16
388	5034.0	0.08

Tabla 12 Extracto del listado de masas de producto filtrado conteniendo PS122

Se concluye por tanto que hay compuesto *PS122* biodisponible tras su ingesta encapsulado en forma de nanopartículas lipídicas y, con ello, que su encapsulación en *NPLs* lo protege de forma efectiva durante el proceso de digestión.

5.3.5 ENSAYOS CON ANTIOXIDANTES

Se ha procedido de forma similar al apartado 5.3.3.1 (página 116) para obtener una recta de calibración de β -caroteno. Se usa 100 mL de una disolución que contiene agua desionizada y 0,2 mg de β -caroteno, buscando la proporcionalidad con el contenido del reactor durante el ensayo posterior.

Usando este preparado como patrón se obtiene un máximo de absorbancia para luz de longitud de onda $\lambda = 400$ nm.

$\mu\text{g/mL}$	A
0,02	0,241
0,04	0,27
0,06	0,343
0,08	0,423
0,1	0,490
0,12	0,570
0,14	0,601
0,16	0,644
0,18	0,693

Tabla 13 Valores de la recta de calibración de beta-caroteno

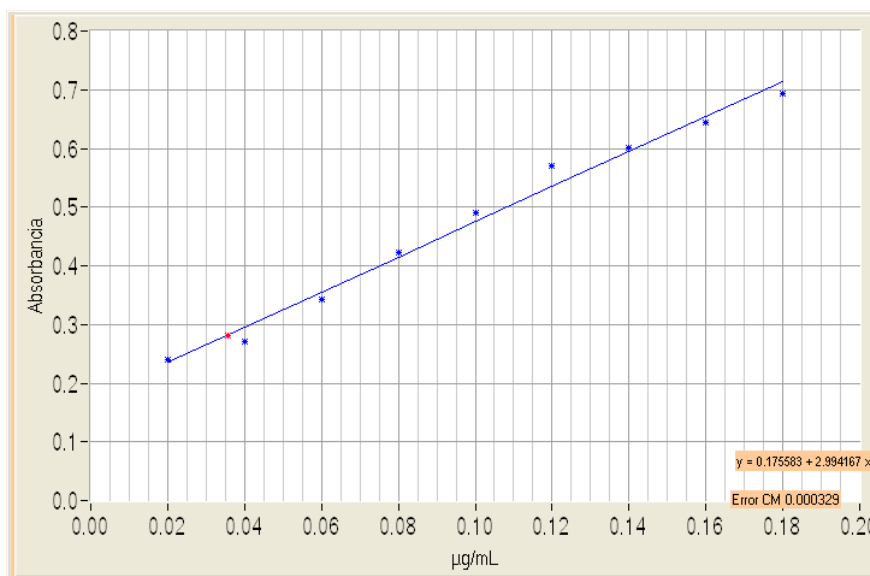


Figura 100 Recta de calibración de β -caroteno

Se realiza una tanda de diluciones de la solución patrón con agua desionizada. En la Tabla 13 se relaciona directamente la concentración de β -caroteno de las diluciones con la medida de absorbancia obtenida.

La Figura 100 muestra la recta de calibración obtenida a partir de los datos de la tabla anterior.

5.3.5.1 Ensayo con alimentos vegetales triturados

Se ha simulado la ingesta 125 gramos de zanahoria triturada, usando procedimiento similar a los descritos en ensayos posteriores.

El tanque agitado del biorreactor contiene 450 mL de medio ácido (agua desionizada a la que se añade HCl hasta alcanzar valor pH 3. Se añade 310 mL de un preparado que contiene 200 mL de agua y 125 gr de zanahoria triturada. Se adiciona 0,6 mL/min de HCl 1M hasta recuperar el valor de pH 3. Durante todo el proceso el tanque está agitado por una turbina que rota a razón de 70 rpm, y se regula la temperatura en $36,6 \pm 1$ °C. Tras 35 minutos, aproximadamente, de simulación gástrica se adiciona 4,5 mL/min de NaCOH₃ 1M hasta alcanzar pH 6. Varios minutos después, cuando se ha superado el valor de pH 5, se adiciona 4 mL/min de una solución que contiene 4 mg/mL de sales biliares disueltas en agua desionizada, hasta dosificar 33 mL de solución. Transcurrida esta fase se inicia la simulación de absorción intestinal haciendo uso de membrana de 50kDa de tamaño de corte molecular (0,05 µm de tamaño de poro). Se configuran las bombas para impulsar un caudal de 20 mL/min y caudal de retorno de 15 mL/min aproximadamente. Son valores muy próximos, por tanto el promedio de presión en los conductos no registra variaciones superiores a 50 mmHg. Se extrae una muestra de producto filtrado para su análisis en el equipo espectrofotómetro.

Se obtiene una medida de absorbancia de 0.282 A para una luz de 400 nm de longitud de onda. El valor obtenido, se extrapola con los datos de la Tabla 13 (punto de color rojo en la recta de la Figura 100) y se obtiene una concentración de 0,04 µg/mL.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El volumen total del reactor, una vez considerados los reactivos que simulan las secreciones corporales, es de 858 mL y la cantidad de β-caroteno aportada teniendo en cuenta los estudios previos (Veda, 2006) que aproximan el contenido en zanahoria cruda de 8 mg/100g:

$$125g_{Zanahoria} \times \frac{8mg_{\beta-c}}{100g_{Zanahoria}} = 0,156mg \quad (27)$$

Por tanto, la concentración inicial de β-caroteno en el biorreactor es:

$$\frac{0,156mg_{\beta-c}}{858mL} = 0,182\mu g / mL \quad (28)$$

Según los cálculos realizados la concentración inicial de β -caroteno es de 0,182 $\mu\text{g/mL}$ y la concentración final, una vez superadas las fases de simulación gastrointestinal es de 0,04 $\mu\text{g/mL}$, Esto supone una biodisponibilidad del 22%.

Existen antecedentes de ensayos de simulación *in-vitro* para determinar la biodisponibilidad de β -caroteno procedente de vegetales. Supriya Veda y otros (Veda, 2006) comprobaron que los métodos basados en membranas de filtración ofrecen resultados aceptables, si bien sus ensayos están descritos con membranas de tamaño de corte molecular de 10 kDa. Según estos autores, son considerados aceptables valores de biodisponibilidad entre el 20% y el 27% en ensayos con zanahorias crudas.

Con los resultados obtenidos, el modelo se considera validado para ensayos que simulan la absorción de β -caroteno usando membrana cerámica de tamaño de poro de 0,05 μm y limitando la regulación de la presión en el módulo de filtración a 50 mmHg.

COMPORTAMIENTO DEL SIMULADOR PARA PRODUCTOS ESPESOS.

Dada la naturaleza grumosa del alimento sometido a ensayo se ha considerado conveniente que los ciclos de trabajo de dilución y retorno no difieran excesivamente entre sí. Una actividad constante de la bomba de retorno facilita el tránsito de productos espesos o con grumos a través de los conductos, y especialmente en el interior de la membrana.

Los ensayos realizados corroboran que la oclusión del circuito de retorno implica un apelmazamiento de producto en la membrana, lo que sugiere una nueva modificación de la aplicación de control, de modo que para fluidos espesos o con grumos, durante la fase de dilución, no cese en ningún momento el funcionamiento de la bomba de retorno y limite la posibilidad de inyectar un caudal comparativamente grande con la bomba de dilución.



Figura 101 Diluciones de β -caroteno

6.- CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

El simulador del tracto gastrointestinal presentado en esta Tesis Doctoral aporta algunas ventajas y a su vez presenta algunos inconvenientes con respecto a otros modelos ya existentes:

VENTAJAS.

- Se dispone de un método simple y rápido con el que se pueden realizar ensayos comparativos con un coste muy bajo. El sistema desarrollado es modular, flexible y versátil. Las aplicaciones informáticas desarrolladas permiten que el método sea fácil de usar.
- Frente a otros modelos estáticos convencionales, el modelo dinámico propuesto permite simular la evolución de acontecimientos durante la ingesta y digestión de alimentos y emular determinados eventos fisiológicos.
- El sistema modular de membrana ahorra tiempo y coste en la simulación dinámica de los procesos de absorción.
- El registro de datos, parámetros y variables durante las distintas fases de la simulación permite realizar análisis posteriores de equilibrio químico que permiten realizar evaluaciones de biodisponibilidad.
- El sistema permite estudiar el punto de liberación de compuestos encapsulados. Además aporta soluciones simples, de rápida ejecución y eficaces para que fabricantes de encapsulados puedan testar sus productos.

DESVENTAJAS.

- El uso de un solo reactor limita la simulación de ingesta durante la digestión únicamente durante la fase gástrica.
- El diseño actual no contempla la adhesión a las células epiteliales.

- Las membranas cerámicas usadas no son válidas para simular la absorción de lípidos.

OTRAS CONCLUSIONES:

- La aplicación del filtro de mediana proporciona al sistema de adquisición de datos una mayor protección frente a perturbaciones eléctricas y transitorias que el promediado aritmético. Los experimentos realizados demuestran que promediar con 6 muestras es suficiente para obtener resultados óptimos.
- Se puede obtener información de liberación de principios activos con determinados encapsulados a partir de los valores registrados de medida de pH
- La presión en los circuitos hidráulicos se puede regular variando los caudales de las bombas peristálticas de impulsión y de retorno, así como la cantidad de producto filtrado por unidad de tiempo. La variación del ciclo de trabajo de cada bomba es un método válido para modificar su caudal.
- El método simple de activar o desactivar la bomba de impulsión en función del resultado de la comparación entre la medida de presión y el valor de consigna es un método válido para regular la presión en el interior del módulo tubular de filtración.
- Es posible realizar ensayos de biodisponibilidad de ácidos grasos como parte de la caracterización de emulsiones alimenticias. Sin embargo no ha sido posible simular satisfactoriamente la absorción de ácidos grasos con la configuración de membranas disponible.
- El encapsulado con nanopartículas lipídicas permite que el macelignano resista el proceso de digestión y favorece su biodisponibilidad, si bien ésta no ha podido ser cuantificada.
- El encapsulado con nanopartículas lipídicas del Taxol® (*paclitaxel*) no supera la digestión gastroduodenal, por tanto no es biodisponible si se ingiere por vía oral en el formato ensayado.

7.- LÍNEAS FUTURAS

7 LÍNEAS FUTURAS

Este capítulo recoge un conjunto de propuestas de actuaciones conducentes a mejorar las prestaciones del prototipo desarrollado así como el uso que se hace del mismo. Las propuestas se han clasificado en dos grupos. En el apartado 7.1, bajo el nombre genérico de *desarrollo de mejoras*, se agrupan un conjunto de actuaciones orientadas a mejorar el rendimiento y prestaciones del sistema. En el apartado 7.2, titulado *nuevos ensayos*, se plantean otros procedimientos y nuevas líneas de investigación que pueden resultar de interés.

7.1 DESARROLLO DE MEJORAS

7.1.1 SISTEMA DE CALEFACCIÓN PARA MÓDULO TUBULAR

Tal como está diseñado el sistema actualmente, la simulación de la temperatura corporal recae en el control de temperatura implementado en el equipo *Biostat*. En una futura ampliación del sistema pudiera interesar regular también la temperatura del módulo tubular de filtración, de forma que no se enfriase durante los ensayos.

La Figura 102 muestra el esquema de montaje de una implementación propuesta, basada en el empleo de una cinta térmica que recubre el módulo tubular. El suministro de potencia a dicha cinta térmica se activa o desactiva con un circuito de conmutación de estado sólido similar al empleado en subsistema de control de pH para accionar las bombas peristálticas. Como sensor de temperatura se propone un dispositivo del tipo *LM35* o similar y con encapsulado *TO220* acoplado a la superficie metálica del módulo.

El sistema de control requiere un salida digital (para actuar sobre el suministro de corriente a la cinta) y una entrada analógica para obtener información del sensor. Una posible solución es usar alguna de las entradas analógicas disponibles del módulo *i-7018* usado para la medida de presión, y un módulo

adicional que incluya salidas digitales, del tipo *i-7060* o similar que se conecta al bus *RS485* ya existente.

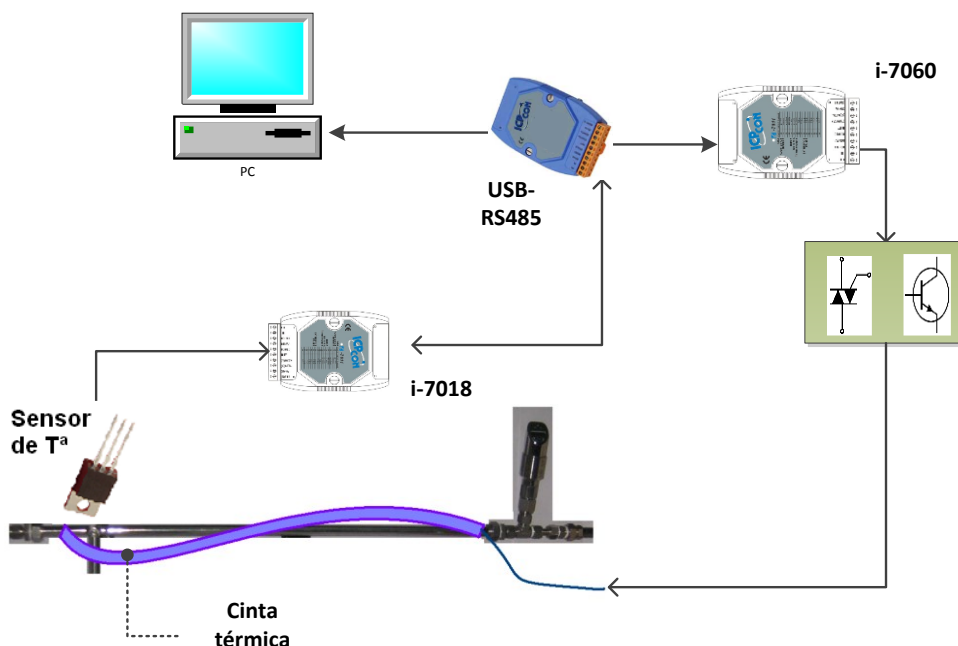


Figura 102 Sistema de calefacción para módulo tubular de filtración

El algoritmo de regulación de temperatura a implementar no presenta grandes dificultades si se recurre a la librería de funciones *PID* que incorpora el entorno de programación *CVI*, y que incluye además utilidades para el ajuste automático de los coeficientes de regulación.

7.1.2 INSERTAR MEDIDAS DEL ESPECTROFOTÓMETRO EN EL PROCESO DE AUTOMATIZACIÓN.

El sistema propuesto en la Figura 103 intercala el equipo de medida entre la salida filtrada del módulo tubular y la balanza de precisión. Se requiere el uso de una bomba peristáltica que controla el flujo de caudal y retiene las muestras durante el tiempo necesario para realizar la medida en el espectrofotómetro. Este tipo de medidas resulta útil para evaluar la presencia de determinados compuestos en el producto filtrado o comparar la concentración de los mismos en diversas etapas de la simulación, entre otras aplicaciones.

También se podría intercalar el equipo espectrofotómetro en el circuito hidráulico de impulsión para realizar medidas del contenido del biorreactor, previas a la fase de absorción.

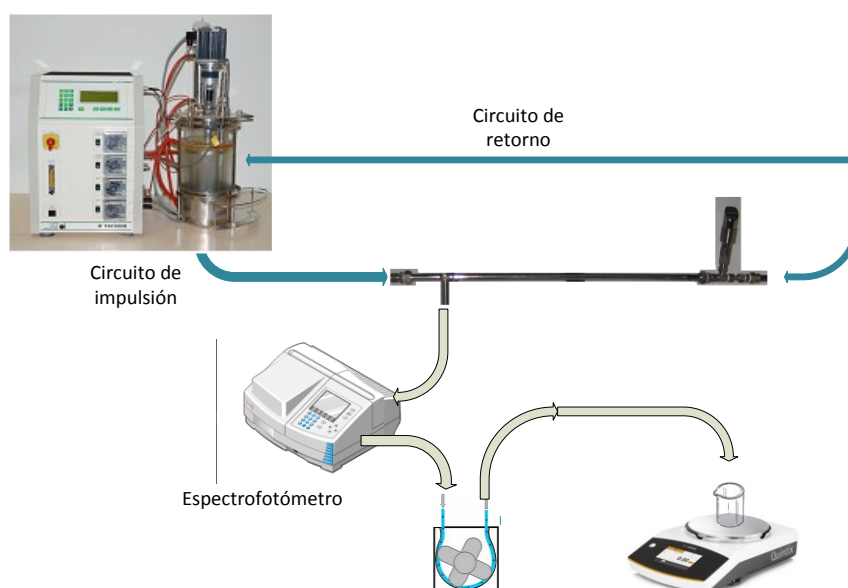


Figura 103 Inserción del espectrofotómetro en el proceso de automatización

7.1.3 INCREMENTAR EL NÚMERO DE ACTUADORES.

De las propuestas anteriores se deduce la conveniencia de incluir en el sistema un módulo tipo *i-7060* o similar, que dispone de varias salidas digitales. Estas salidas, con su correspondiente circuito interfaz cada una, permitirían al sistema poder controlar más bombas peristálticas para dosificar reactivos o regular nuevos circuitos hidráulicos.

Estos cambios implican realizar algunos cambios en los programas además de incluir nuevos campos en el fichero de configuración que permitan identificar al software los nuevos dispositivos controlados.

7.1.4 REGULAR CAUDALES EN BASE AL CAUDAL MÁSCO DE PRODUCTO FILTRADO.

Es posible desarrollar un conjunto de funciones que permiten controlar la presión en el módulo tubular de filtración actuando sobre los ciclos de trabajo de las bombas peristálticas que regulan el caudal de los circuitos hidráulicos de impulsión y de retorno.

En determinados ensayos podría resultar interesante regular directamente el caudal másico de producto filtrado. Para ello se propone desarrollar un control difuso cuyas entradas sean los caudales actuales de las bombas peristálticas de impulsión y de retorno, la medida de presión y el valor de consigna establecido (Figura 104). Las salidas difusas son los nuevos caudales que hay que asignar a

las bombas. Se pueden considerar los caudales de las bombas de modo independiente u operar con la diferencia entre los mismos.

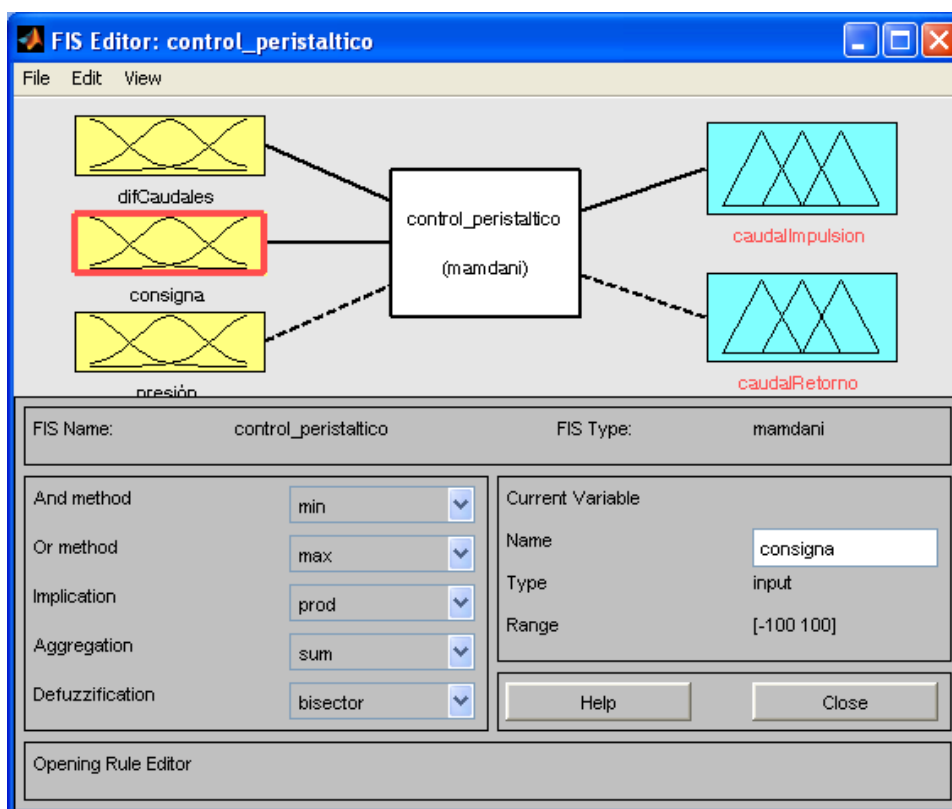


Figura 104 Editor de control difuso de Matlab

El uso de controles difusos aporta algunas ventajas con respecto a otros algoritmos similares. No es necesario el uso de coeficientes ni hay variaciones bruscas de caudales. Además se adaptan mejor a los cambios debidos a variaciones de concentración o alteraciones debidas a reacciones químicas. También presentan algunos inconvenientes tales como mayor tiempo de respuesta o que requieren más capacidad de proceso (consumen más recursos de memoria y uso de *CPU*).

7.2 NUEVOS ENSAYOS

7.2.1 BIODISPONIBILIDAD DE PACLITAXEL

El ensayo descrito en el apartado 5.3.4.3 ha concluido que el paclitaxel (Taxol®) se degrada durante la fase de digestión gástrica. Este resultado no sorprende, por cuanto que dicho medicamento se suministra por otras vías, distintas de la oral, en tratamientos anticancerígenos.

Existen trabajos que documentan la mejora de eficacia del paclitaxel cuando se combina con macelignano (Quiang, 2010). Se propone no desistir en la búsqueda de nuevas formulaciones que permitan mejorar la biodisponibilidad de este medicamento.

7.2.2 BIODISPONIBILIDAD DE LÍPIDOS

Las membranas cerámicas que se han empleado en el prototipo simulador del tracto gastrointestinal no permiten simular adecuadamente la absorción de lípidos. Se sugiere utilizar membranas específicas o bien aplicar métodos de equilibrio químico que permiten deducir la cantidad de grasas asimiladas en función de la cantidad de base necesaria para mantener el pH constante.

Es posible relacionar (Ahmed, 2012; Tzoumaki, 2013) la cantidad de ácidos grasos liberados por lipólisis con el volumen de NaOH añadido durante la regulación de pH en la fase de simulación del intestino delgado. Si se consigue mantener estable el nivel de pH, se asume que el porcentaje de ácidos grasos liberados (*FFA*) por la acción de las lipasas está determinado por la cantidad de moles de NaOH añadidos para neutralizarlos.

$$\%FFA = \frac{V_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot MW_{oil}}{w_{oil} \cdot 2} \cdot 100 \quad (29)$$

En la ecuación (29) V_{NaOH} es el volumen de hidróxido sodio (mL) requerido para neutralizar los ácidos grasos liberados; M_{NaOH} es la molaridad de la disolución usada de NaOH; MW_{oil} es el peso medio molecular (g/mol) del lípido; w_{oil} es el peso total (g) de lípido presente en el reactor. Se asume que se liberan dos cadenas de ácido graso por cada molécula de triglicérido.

7.2.3 ENSAYOS DE PROBIÓTICOS

Aunque no se ha documentado en esta Tesis Doctoral, el prototipo simulador del tracto gastrointestinal descrito es adecuado para estudiar la supervivencia de probióticos. Como línea futura se propone documentar adecuadamente el protocolo de esterilización del reactor y conductos accesorios, previo al ensayo con probióticos e incluir dicho protocolo en la automatización, de modo que el programa *BioDigestor* recuerde al usuario los pasos a seguir en cada momento y realice de modo automático la limpieza de la membrana cerámica accionando

la bomba que impulse el caudal adecuado de producto de limpieza por el interior del módulo de filtración.

7.2.4 ENSAYOS DE SIMULACIÓN QUE INCOPOREN LA FLORA BACTERIANA

Es posible realizar la fase de simulación del intestino grueso con el sistema desarrollado, aunque no se haya descrito ningún ejemplo. La simulación del colon conlleva el incorporar cultivos de flora bacteriana. Este tipo de ensayos permitiría experimentar con encapsulados de fármacos configurados para que su sitio de liberación sea el colon.

8.- BIBLIOGRAFÍA y REFERENCIAS

8 BIBLIOGRAFÍA y REFERENCIAS

8.1 BIBLIOGRAFÍA.

Bolton, W. *Instrumentación y Control Industrial*. Paraninfo, 1991. ISBN 84-283-2279-1.

Cilla, Antonio. *Actividad antioxidante y biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de minerales y/o leche*. Tesis Doctoral. Universitat de València, 2010. ISBN 978-84-370-7797-0.

Ewe, K.; Karch, U. "Functions of the alimentary canal". *Human Physiology*. 24th edition. Springer Berlin, 1869. ISBN 978-3-642-73831-3

Haster, William L. "Small Intestinal Motility". *Physiology of the Gastrointestinal Tract. Volume I. Chapter 38*. Fourth edition. Elsevier Academic Press, 2006. ISBN 0-12-088395-3.

Havenaar, R.; Minekus, M.; Venema, K. "Antimicrobial growth promoters". *Use of in-vitro models of the gastrointestinal track (TIM systems and bioassays) for studying replacements for AGPs. Páginas 183-192*. Wageningen Academic Publishers, 2006. e-ISBN 978-90-8686-570-3.

Huang, H. *Fermentation control and modeling with application in production of thermo-stable alpha-amylase using recombinant bacillus subtilis*. Dissertation in partial fulfillment of the requirements for the degree Doctor of Philosophy. College of Engineering and Technology of Ohio University, 2002.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Tratado de Fisiología Médica*. Décima edición. McGraw-Hill Interamericana, 2001. ISBN 84-486-0322-2.

Johnson, L.R. *Physiology of the Gastrointestinal Tract. Volume II*. Fourth edition. Elsevier Academic Press, 2006. ISBN 0-12-088395-3.

Keshav, S. *The Gastrointestinal System at a Glance*. First edition. Blackwell Science Ltd. 2004. ISBN 0-632-05472-7

Martínez-Férez, A. *Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2007. ISBN 978-84-338-4711-9.

Mkondweni, N.S. *Modelling and optimal control of fed-batch fermentation process for the production of yeast*. Thesis. Cape Peninsula University of Technology, 2002.

Nielsen, J. "Usability Testing". *Usability Engineering. Chapter 6*. Boston. Ap. Professional, 1993. ISBN 0-12-25184069.

Ogata, K. *Ingeniería de Control Moderna*. Tercera edición. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 1998. ISBN 970-17-0048-1.

Rivas-Montoya, E. *Preparación de nanopartículas lipídicas y caracterización por AFM y Raman*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Málaga, 2008.

Rivas-Montoya, E. *Automatización de procesos en reactores químicos*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Málaga, 2014.

Sarna, S. K.; Shi, X. "Function and Regulation of Colonic Contractions in Health and Disease". *Physiology of the Gastrointestinal Tract. Volume I. Chapter 39*. Fourth edition. Elsevier Academic Press, 2006. ISBN 0-12-088395-3.

8.2 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.

Abraham, Michael H. et al. "On the mechanism of human intestinal absorption". European Journal of Medicinal Chemistry, 37: 595-605 (2002).

Ahmed, K.; Li, Y.; McClements, D.J.; Xiao, H. "Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties". Food Chemistry, 132: 799-807 (2012).

Alameida, P.V.; Grégio, A.M.; Machado, M.A.; de Lima, A.A.; Azevedo, L.R. "Saliva composition and functions: a comprehensive review". The journal of contemporary dental practice, Marzo 9(3): 72-80 (2008).

Alander, M; De Smet, I.; Nollet, L; Verstraete, W; von Wright A.; Mattila-Sandholm, T. "The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME)". International Journal of Food Microbiology, 46: 71– 79 (1999).

Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crimson, J. R. "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability". *Pharmaceutical research*, 12(3): 413-420 (1995).

Artursson, P.; Borchardt, R. "Intestinal Drug Absorption and Metabolism in Cell Cultures: Caco-2 and Beyond". *Pharmaceutical Research*, (14): 1655-1657 (1997).

Blanquet, S.; Zeijdner, E.; Beyssac, E.; Meunier, J.P.; Denis, S.; Havenaar, R. "A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions". *Pharmaceutical Research*, 21: 585–591 (2004).

Camilleri, M. et al. "Measurement of gastrointestinal motility in the GI laboratory". *Gastroenterology*, 115(3): 747-762 (1998).

Caussy, D. "Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 164-173 (2003).

Cheng J.Y et al. "Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*". *Phytomedicine*, 12: 261-266 (2005).

Cobo M.; García M.; Torres J.; Páez F.; Arrabal Sánchez R.; Pagés Navarrete C. "Avances en el tratamiento sistémico del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado". *Rev. Neumosur*, 18: 151-161 (2006).

Conrad, M. E.; Crosby, W. H.; Merrill, B. "Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption". *Blood*, 22(4):4 06-415 (1963).

Crews, H.M.; Burrell, J.A.; McWeeny, D.J. "Preliminary enzymolysis studies on trace element extrability from food". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34: 997-1004 (1983).

De Boever, P.; Wouners, R.; Vermeirssen, V.; Boon, N.; Verstraete, W. "Development of a Six-Stage Culture System for Simulating the Gastrointestinal Microbiota of Weaned Infants". *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13: 111-123 (2001).

De Wiele, T. Van; Boon, N.; Possemiers, S.; Jacobs, H.; Verstraete, W. "Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem". *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 143–153 (2004).

Di Constanzo, F.; Manzione, L.; Gasperoni, S.; Bilancia, D. "Paclitaxel and mitoxantrone in metastatic breast cancer: a phase II trial of the Italian Oncology Group for Cancer Research". *Cancer Investigation*, 22: 331-337 (2004).

Díez, O.; Herráez, H. "Importancia de los sistemas de liberación prolongada en los preparados dermofarmacéuticos". XIV Congreso nacional farmacéutico. Alicante (2004).

Duffo, G.S.; Castillo, E.Q.; "Development of an artificial saliva solution for studying the corrosion behavior of dental alloys". *The Journal of Science and Engineering*, 60(6): 594-602 (2004).

Fuentealba, C.; Figuerola, F.; Estévez, A.M.; Bastías, J.M. "Bioaccessibility of lignans from flaxseed (*Linum unitatissinum* L.) determined by single-batch *in*

vitro simulation of the digestive process”. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(9): 1729-1738 (2014).

Herrera Ruiz, D., Hernández Baltazar, E., Espinosa-Lara, J.C., Martínez, I. L., Beltrán-Torres, A.A., Martínez-Alejo, J.M. “Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos”. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [en línea], 43 (2012).

Hoebler, C.; Devaux, M.F.; Karinthe A.; Belleville, C.; Barry, J.L. “Particle size of solid food after human mastication and in vitro simulation of oral breakdown”. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 51(5): 353-366 (2000).

Hu, J.L; Nie, S.P.; Min, F.F.; Xie, M.Y. “Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica L*”. Carbohydrate Polymers, 92: 1143-1150 (2013).

Huang, H.; Gu, T.; Moo-Young, M. “Data acquisition and control of a 22 L B. Braun Fermenter using LabVIEW”. Chemical engineering Communications, 192(1/3): 127-144 (2005).

Humphrey, SP.; Williamson, RT. “A review of saliva: normal composition, flow and function”. The Journal of Prosthetic Dentistry, 85(2): 162-169 (2001).

Hur, S J; Lim, B.O.; Decker, E.A.; McClements, D.J. “*In vitro* human digestion models for food applications”. Food Chemistry, 125(1): 1-12 (2011).

Hwang, Paul S.; Kim, J.K.; Jeon, H.Y.; Chung, W.K.; Han, J.S. “Multiple biological properties of macelignan and its pharmacological implications”. Rev. Archs. Pharm. Res., 36: 264-272 (2013).

Jiménez-Colmenero, F. “Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales”. Nutrición Hospitalaria, 28(5): 1413-1421 (2013).

Kalantzi, L.; Goumas, K.; Kalioras, V.; Abrhamsson, B. Dressman, J.B.; Reppas, C. “Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies”. Pharmaceutical Research, 23(1): 165-175 (2006).

Kontula, P.; Jaskari, J.; Nollet, L.; De Smet, I.; von Wright, A.; Poutanen, K.; Mattila-Sandholm, T. "The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strainfed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota". Appl. Microbiol. Biotechnol., 50: 246–252 (1998).

Laza L.D.; Rodríguez L.I.; Sardiña C.G. "Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales". Rev. Cubana Plant. Med. 8: 157-163 (2003).

Lindhal, A.; Ungell, A.L.; Knutson, L.; Lennernäs, H. "Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women". Pharmaceutical Research, 14(4): 497-502 (1997).

Mainville, I.; Arcand, Y.; Farnworth, E.R. "A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics". International Journal of Food Microbiology, 99(3): 287-296 (2005).

Marques, M.R.C.; Loebenberg, R.; Almukainzi, M. "Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing". Dissolution Technologies, Agosto: 15-28 (2011).

Mattila-Sandholm, T.; Mättö, J.; Saarela, M. "Lactic acid bacteria with health claims interactions and interference with gastrointestinal flora". Int. Dairy J. 9: 25–35 (1999).

Mcclements, D.J. "Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components". The Annual Review of Food Science and Technology, 1: 241-269 (2010)

Mcclements, D.J; Decker, E.A.; Park, Y. "Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49: 48-68 (2009).

Miller, D.D.; Schricker, B.R.; Rasmussen, R.R.; van Campen, D. "An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals". The American Journal of Clinical Nutrition, 34: 2248-2256 (1981).

Minekus, M. y otros. "A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food". Food and Function, 5: 1113-1124 (2014).

Minekus, M.; Marteau, P.; Havenaar, R.; Huis, J.H.J. “A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine”. *Alternatives to Laboratory Animals*, 23: 197–209 (1995).

Molly, K.; Woestyne, M. Vande; Verstraete, W. “Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 254–258 (1993).

Müller R.H.; Mäder K.; Gohla S. “Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art”. *Eur J.Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*, 50: 161-177 (2009).

Nolasco, H.; del Monte-Martínez, A.; Hinojosa, P.; Civera-Cerecedo, R.; Vega-Villasante, F. “Digestibilidad *in vitro* de Lípidos Alimentarios para el Camarón”. *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León. México (2006).

Palma, S.; Allemandi, D. “Administración de fármacos a través de nanopartículas lipídicas sólidas (NPS) y lípidos nanoestructurados (LNE)”. *Farmacotecnia* 57: 40-47 (2002).

Paul, S.; Hwang, J.K.; Kim, H.Y.; Chung, C.; Han, J.S. “Multiple biological properties of macelignan and its pharmacological implications”. *Archives of Pharmaceutical Research*, 36: 264-272 (2013).

Possemiers, S.; Verthe, K.; Uyttendaele, S.; Verstraete, W. “PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem”. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 495-507 (2004).

Qiang, F.; Lee, B.J.; Ha, I.; Kang, KW; Woo, E.R.; Han, H.K. “Effect of macelignan on the systemic exposure of paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2): 226-231 (2010).

Radtke, M.; Souto, E. B.; Müller, R. H. “Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Generation of Solid Lipid Drug Carriers”. *Pharmaceutical Technology Europe*, 17: 45-50 (2005).

Ritter, P.; Kohler, C; Von Ah, U. "Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model". BMC Microbiology 9: 87 (2009).

Salazar L. A.; Medina F.; Donoso F.; Barrientos L.; Sanhueza A. "Acción Antimicrobiana *in vitro* de la Miel de Abejas sobre los Microorganismos Cariogénicos. *Streptococos* del Grupo mutans". Int. J. Morphol. 27: 77-82 (2009).

Schuch, A.; Deiters, P.; Henne, J.; Köhler, K.; Schuchmann, H.P. "Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water". Journal of Colloid and Interface Science, 402: 157-164 (2013).

Sedef N. El; K. Sibel; Gülay, O.; K. Nazli. "Protein profiles and release from spaghetti and wheat bran spaghetti after *in-vitro* digestion". 2nd International Conference on Food Digestion. Cost-Infogest. 2013.

Singh, H.; Ye, A.; Horne, D. "Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion". Progress in Lipid Research. 48, 92-100 (2009).

Soto H. M.; Sanjurjo, M.; González, G.T; Cruz V. D.; Giral G. F. "El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol", Ciencias Naturales y Agropecuarias, 7: 277-279 (2000).

Sparreboom, A.; van Tellingen, O.; Nooijen, W.J.; Beijnen, J.H. "Nonlinear Pharmacokinetics of Paclitaxel in Mice Results from the Pharmaceutical Vehicle Cremophor EL". The Journal of Cancer Research, 56: 2112-2115 (1996).

Sumeri, I.; Arike, L.; Admberg, K.; Paalme, T. "Single bio-reactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria". Applied Microbiology and Biotechnology, 80: 317-324 (2008).

Tompkins, T.A.; Mainville, I.; Arcand, Y. "The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract". Beneficial Microbes, 2(4): 295-303 (2011).

Tzoumaki, M.V.; Moschakis, T.; Scholten, E.; Biliaderis, C.G. "*In vitro* lipid digestion of chitin nanocrystal stabilized o/w emulsions". Food Function, 4: 121-129 (2013).

Vamanu, E.; Pelinescu, D.; Marín, I.; Vamanu, A. “Study of probiotic strains viability from PROBAC product in a single chamber gastrointestinal tract simulator”. Food Science and Biotechnology, 21(4): 979-985 (2012).

Van Campen, D.R.; Glahn, R.P. “Micronutrient bioavailability techniques accuracy, problems and limitations”. Field Crops Research, 60: 93-113 (1999).

Veda, S.; Kamath, A.; Platel, K.; Begum, K.; Srinivassan K. “Determination of bioaccessibility of β -carotene in vegetables by *in vitro* methods”. Molecular Nutrition and Food Research, 50: 1047-1052 (2006).

8.3 PATENTES.

AINIA. “Equipo modular de digestión in vitro”. España, número de publicación 2.361.983. 3 de mayo de 2.012.

Due Miljø As. “Process for extracting fatty acids from aqueous biomass in a membrane contactor module”. International Publication Number WO 201010143974 A1. Dec. 2010.

Unversiteit Gent (BE). “Technology and method to study microbial growth and adhesion to host-related surface and the host-microbiota interactions”. International Publication Number WO 2010/118857-A2. 21 October 2.010.

8.4 OTROS DOCUMENTOS Y REFERENCIAS WEB.

E.K. Springer. *pH Measurement Guide*. Hamilton Company.

M.H. Andersen. “Fermentor Control Program”, *manual version released 15*. FoxyLogic, 2005.

“MFCS /win 2.0”. *Release Notes 2.0 (SP4A)*. B. Braun Biotech International GmbH, 2001.

“Operation Manual BIOSTAT B”. B. Braun Biotech International GmbH.

<http://www.ainia.es>

(Portal del Centro Tecnológico AINIA)

<http://www.analog.com/en/index.html>

(Portal del fabricante *Analog Devices*).

http://www.icpdas.com/root/product/solutions/remote_io/remote_io_products.html

(página web con enlaces a los módulos de control remoto de entrada/salida de *ICP-DAS*).

<http://www.prodigest.eu/EN/technology/invitrosimulationtechnologies>

(página web SHIME)

<http://www.rousselet.com/es/>

Portal de importante empresa proveedora de gelatinas para la elaboración de cápsulas blandas.

<http://www.ti.com>

(Portal del fabricante *Texas Instruments*).

https://www.tno.nl/content.cfm?context=thema&content=markt_product&laag1=891&laag2=195&laag3=320&item_id=1100&Taal=2

(página web donde se presenta el equipo TIM)

9.- ANEXOS

9 ANEXOS

- Anexo I Glosario de términos y acrónimos
- Anexo II Comunicaciones: Interfaces y conexiones
- Anexo III Algoritmos de regulación
- Anexo IV Manuales de usuario de los programas desarrollados
- Anexo V Informes de análisis químicos

ANEXO I: GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ACRÓNIMOS

A.O. Amplificador Operacional.

Absorbancia Medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante. (*Fuente: RAE*)

ActiveX Arquitectura definida como parte de la tecnología Win32 para la comunicación entre aplicaciones de software que corren simultáneamente, ya sea dentro o fuera de proceso. Automatización ActiveX define las formas en las cuales los procesos separados pueden comunicarse entre sí. (*Fuente: ni.com*)

Aducto En química, es un producto AB formado por la unión directa de dos moléculas A y B , sin que se produzcan cambios estructurales en su topología.

Archivo Conjunto de bits que son almacenados en un dispositivo. Es identificado por un nombre y la descripción de la carpeta o directorio que lo contiene.

Array Término anglosajón usado en programación, referido a un vector o matriz. Bajo este nombre se suele denominar a una zona de almacenamiento continuo que contiene una serie de elementos de un mismo tipo.

ASCII Acrónimo inglés de “American Standard Code for Information Interchange” (Código Estándar Estadounidense para el Intercambio de Información). Es un código de caracteres basado en el alfabeto latino. El código ASCII utiliza 7 bits para representar los caracteres, e inicialmente empleaba un bit adicional (bit de paridad) que se usaba para detectar errores en la transmisión.

Aplicación Programa preparado para una utilización específica. (*Fuente: RAE*)

Bar Medida de presión atmosférica, equivalente a 100.000 pascales. (*Fuente: RAE*)

Biodisponibilidad En el contexto de la simulación del sistema digestivo, referido a una cantidad de alimento o principio activo digerido, la biodisponibilidad es la fracción de elemento que finalmente es absorbido en el intestino.

Callback En programación *CVI*, nombre genérico asignado con el que se designa a una función que es llamada de forma automática como respuesta a un evento (una acción sobre un elemento de una interfaz de usuario, interrupción provocada por un puerto de comunicaciones, fin de una temporización, etc.).

Checksum Algoritmo que tiene como propósito principal detectar cambios accidentales en una secuencia de datos transmitidos para proteger la integridad de estos, verificando que no haya discrepancias entre los valores obtenidos al hacer una comprobación inicial y otra al final de la transmisión.

Diálisis Proceso de difusión selectiva a través de una membrana, que se utiliza para la separación de moléculas de diferente tamaño. (*Fuente: RAE*)

Electrodo Extremo de un conductor en contacto con un medio, al que lleva o del que recibe una corriente eléctrica. (*Fuente: RAE*). Conductor eléctrico utilizado para hacer contacto con una parte no metálica de un circuito.

Fichero Ver definición de *Archivo*.

LSB Acrónimo inglés del término traducido como “bit menos significativo”. En adquisición de datos hace referencia a la resolución.

mbar Milibar, milésima parte de un bar (medida de presión).

Microbiota La RAE define biota como conjunto de fauna y la flora de una región. En el contexto del sistema digestivo, ya sea animal o humano, se utiliza el término microbiota para referirse a la biota del tracto gastrointestinal, normalmente compuesta de bacterias y otros microorganismos.

mmHg Milímetro de mercurio. Unidad de presión que equivale, aproximadamente, a 133,322 Pa. Una atmósfera equivale a 760 mmHg.

Motilidad La R.A.E. describe este término como “facultad de moverse”. En biología o medicina se suele referir genéricamente a motilidad gastrointestinal o acción fisiológica que permite el desplazamiento de sustancias a través del tubo digestivo.

Neoplasia Multiplicación o crecimiento anormal de células en un tejido del organismo. *(Fuente: RAE)*

PID Acrónimo empleado para denominar de modo genérico a un algoritmo proporcional integral derivativo. Un *PID* es un mecanismo de control por realimentación que calcula la desviación o error entre un valor medido y el valor que se quiere obtener, para aplicar una acción correctora que ajuste el proceso.

Posprandial Posterior a las comidas. *(Fuente: RAE)*

Postprandium Término usado en medicina para referirse de modo genérico a procesos o acciones sobre el bolo alimenticio, una vez que éste sale del estómago.

Probióticos Microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped. *(Fuente: OMS)*

Programa Conjunto unitario de instrucciones que permite a un ordenador realizar funciones diversas. *(Fuente: RAE)*

psi Acrónimo inglés de “pounds-force per square inch” (libra-fuerza por pulgada cuadrada). Unidad de presión equivalente a 6.894,75 Pa. Aproximadamente, 15 psi equivalen a una atmósfera.

Resolución Distinción o separación mayor o menor que puede apreciarse entre dos sucesos u objetos próximos en el espacio o en el tiempo. *(Fuente: RAE)*. La resolución de un sensor es la menor variación que se puede detectar en la cantidad que se está midiendo. La resolución de un convertidor analógico/digital es la variación de tensión más pequeña que el sistema puede distinguir.

rpm Revoluciones por minuto. Unidad de velocidad angular que se suele usar para medir rotaciones de un eje.

Sensor Dispositivo que detecta magnitudes físicas y las convierte en variables eléctricas.

Sonda de temperatura Dispositivo que, por medios mecánicos o eléctricos, transmite de un lugar (emisor) a otro (receptor) la temperatura existente en el emisor.

Usabilidad Eficacia, eficiencia y satisfacción con la que un producto permite alcanzar objetivos específicos a usuarios específicos en un contexto de uso específico. (*ISO/IEC 9241*)

ANEXO II: COMUNICACIONES: INTERFACES Y CONEXIONES

II.1 ANÁLISIS DE COMUNICACIONES POR EL BUS RS-422

Las conexiones de interfaz entre el ordenador de control y la unidad fermentadora se realizan según una configuración clásica de servidor-esclavo. Un bus de comunicaciones *RS-422* permite a un mismo ordenador, que actúa como unidad central, controlar a varios fermentadores, que actúan como sub-estaciones. Se realiza una conexión a cuatro hilos, y es posible modificar algunos parámetros tales como velocidad de transferencia, longitud de datos o dirección de la sub-estación.

No se dispone de información sobre el formato en el que se transfieren los datos. Los respectivos manuales de las aplicaciones de control disponibles, *MCFS* (B. Braun Biotech) y *Fermentor Control Program* (FoxyLogic) permiten deducir las funciones y tareas que se pueden programar, pero no el cómo. El formato de los comandos de control se ha deducido usando dos métodos alternativos:

- Se han consultado trabajos realizados por otros autores que han usado modelos de fermentadores similares (Huang, 2002; Mkondweni, 2002).
- Se ha analizado el flujo de datos durante la comunicación entre el sistema *Biostat* y los programas de control referidos anteriormente.

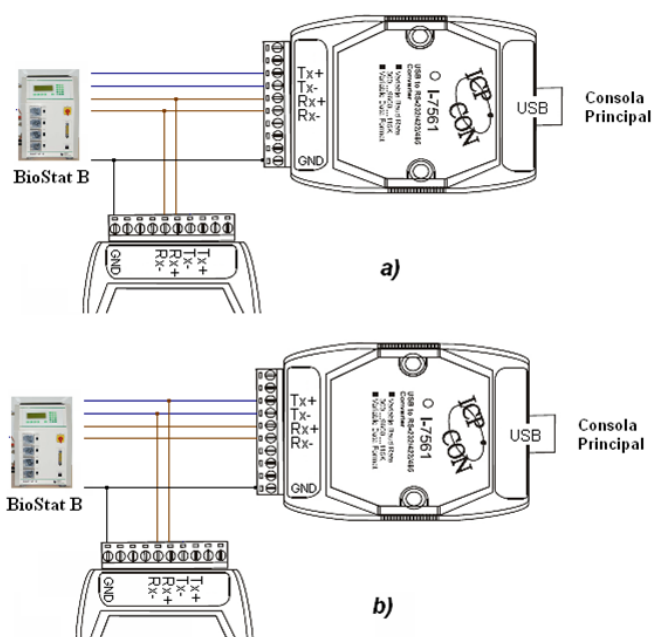


Figura 105 Análisis de transferencia de datos entre ordenador y Biostat

Para analizar la transmisión de datos por el puerto serie se dispuso de dos convertidores *USB/RS422*, tal como se muestra en la Figura 105.

Un convertidor principal permite establecer la conexión entre el ordenador ubicado en el laboratorio y el equipo *Biostat* y un segundo convertidor conectado de forma que no interfiere la comunicación permite “espiar” desde un portátil las comunicaciones en uno y otro sentido.

La Figura 105a muestra la conexión que permite identificar las respuestas procedentes del sistema *Biostat*.

La Figura 105b muestra la conexión para poder espiar los mensajes enviados por el ordenador. En ambos casos, el portátil solo puede “escuchar”. Como se ha indicado, no se conecta el canal de transmisión para no interferir en la comunicación.

El seguimiento de las comunicaciones se ha llevado a cabo empleando el programa *Crosstalk* (programa clásico de comunicaciones para sistemas operativos “MS-Dos”) y también se ha usado la aplicación de diseño propio, denominada genéricamente *Comunica*, y que ha sido desarrollada usando el entorno de programación *CVI* suministrado por *National Instruments*. La Figura 106 muestra una captura de pantalla de dicho programa.

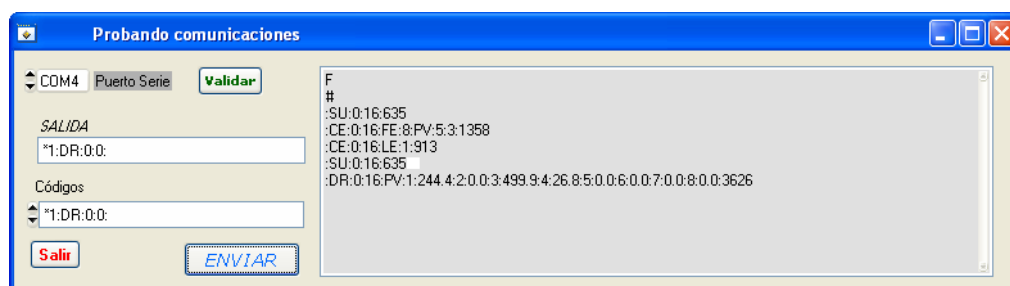


Figura 106 Captura de pantalla del programa *Comunica*

Con la información adquirida se ha elaborado de forma simultánea un programa denominado *Communicator* que ha permitido simular el comportamiento del equipo durante la fase de desarrollo y evaluación del software de control. Este programa devuelve datos en el mismo formato que lo haría el equipo *Biostat*. De este modo es posible ahorrarse multitud de desplazamientos al laboratorio cada vez que se desea probar una modificación del software.

En definitiva, la transmisión se compone de un conjunto de comandos y respuestas, con estructura de mensajes (los citados autores los denominan telegramas), consistentes en una serie de órdenes, valores y “checksum”. Todos los mensajes responden a un mismo formato y son descritos seguidamente.

II.1.1 Mensajes enviados por el ordenador

Todos los mensajes enviados empiezan con el carácter “*” y terminan con el carácter “@”. Además, son precedidos de una señal de “*break*”. Este tipo de señales está estandarizado en comunicaciones serie, y permite que los dispositivos conectados pasen a modo de *Recepción* (sería como una *llamada de atención*). La duración de la señal de “*break*” debe ser similar aproximadamente la que se emplea para transmitir dos caracteres consecutivos. Para comunicaciones a 9600 baudios, este tiempo es de aproximadamente 2ms. El formato de los mensajes enviados es el siguiente:

*:DIR:COMANDO:0:0:ACCION:CANAL:PARAMETRO:CHECKSUM:@

DIR: El uso del bus de comunicaciones RS-422 permite conectar varios periféricos con un mismo equipo principal (“host”). La identificación de cada uno de los periféricos se realiza incluyendo en la cabecera de los mensajes la dirección asociada al periférico al que va destinada la información.

COMANDO: Se trata de un código de dos letras asociado con un comando, u orden previa a la ejecución de una acción. Los comandos disponibles son:

DR, “data request”: Mensaje enviado para requerir información.

DS, “data set”: Envía datos para configura un proceso.

SU, “setup”: Inicializa el sistema.

Las acciones que se realizan son:

CM: Inicia el sistema de control asociado con el canal si el parámetro es 1, o lo detiene si el parámetro es 0.

CS: Modifica el parámetro asociado con el canal indicado.

CANAL	CONTROL	MARGEN	UNIDAD	PARÁMETRO
1	Temperatura	0 - 100	°C	0 - 1000
2	Agitador	0 - 1200	Rpm	0 - 1000
3	pH	2,0 – 12,0	pH	0 - 1000
4	pO2	0 - 100	% sat	0 - 1000
5	SUBS1	0 - 100	% (ciclo de trabajo)	0 - 1000
6	SUBS2	0 - 100	% (ciclo de trabajo)	0 - 1000

Tabla 14 Controles del sistema Biostat

La Tabla 14 relaciona los canales empleados en la comunicación con los subsistemas controlados, los valores de consigna admitidos para cada control y los parámetros empleados, una vez que se han adecuado determinadas magnitudes.

CHECKSUM: Se trata de un algoritmo empleado para verificar que la comunicación se está realizando correctamente. Un mensaje está formado por un conjunto de caracteres ASCII. A cada carácter le corresponde un código numérico. El término “checksum”, en la comunicación analizada, se refiere a la suma matemática de los códigos de todos y cada uno de los caracteres enviados.

El sistema que recibe el mensaje, realiza a su vez la suma de los códigos de los caracteres recibidos, y compara el resultado obtenido con el valor recibido. Si son iguales, la transmisión ha sido correcta; de no ser así, la transmisión ha sido incorrecta, y se genera el correspondiente mensaje de error.

II.1.2 Mensajes de respuesta

Cada mensaje enviado por el ordenador genera el correspondiente mensaje de respuesta por parte del sistema *Biostat*, que se rige por normas similares. Todos los mensajes de respuesta empiezan por el carácter “#” y la dirección del equipo que genera el mensaje, y terminan por el carácter “@”. Al igual que los mensajes de comando, van precedidos de una señal de “*break*”, incluyen “*checksum*” y emplea el signo de dos puntos “:” como elemento separador.

#DIR:CUERPO:CHECKSUM:@

El cuerpo del mensaje de respuesta incluye encabezados similares al comando enviado. Estos encabezados son:

- SU: Confirmación de inicialización de sistema.
- DS: Confirma la recepción de datos.
- DR: Devuelve información de controles.
- CE: Comando erróneo o parámetros incorrectos.

Como respuesta a una petición de datos, el sistema *Biostat* envía los valores medidos de una serie de controles.

CANAL	CONTROL	MARGEN	UNIDAD	PARÁMETRO
1	Temperatura	0 - 100	°C	0 - 1000
2	Agitador	0 - 1200	rpm	0 - 1000
3	pH	2,0 – 12,0	pH	0 - 1000
4	pO2	0 - 100	% sat	0 - 1000
5	ACIDO	0 - 500	mL	0 - 1000
6	BASE	0 - 500	mL	0 - 1000
7	SUBS1	0 - 500	mL	0 - 1000
8	SUBS2	0 - 5000	mL	0 - 1000

Tabla 15 Valores medidos por el sistema *Biostat*

La Tabla 15 asocia dichos controles con sus correspondientes canales así como con el margen de medidas. Estas mismas reglas son las que hay que aplicar, de forma inversa, para configurar un parámetro del equipo *Biostat*.

TEMPERATURA: El parámetro devuelto se corresponde con la temperatura medida por el sistema.

$$T^a (^{\circ}\text{C}) = \text{Param.} / 10$$

AGITADOR: Es sistema devuelve la velocidad real de giro de las paletas, en revoluciones por minuto.

$$\text{Velocidad (r.p.m.)} = \text{Param} * 1,2$$

pH: El margen de medidas de pH comprende entre 2 (parámetro 0) y 12 (parámetro 1000).

$$\text{pH} = (\text{Param.} - 200) / 100$$

VOLUMEN de ácido, base y subs1: El equipo devuelve la suma de los volúmenes parciales de los reactivos dosificados. Esta suma se pone a cero al encender el equipo y después de una orden de inicializar el sistema.

$$\text{Vol (mL)} = \text{Param.} / 2$$

VOLUMEN de subs2:

$$\text{Vol (mL)} = \text{Param.} / 10$$

II.2 INTERFAZ CON SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS

Los módulos de la familia *i-7000* usados en este trabajo disponen de conexión *RS-485* para comunicarse con el ordenador mediante comandos serie. Se usa un módulo *i-7520* que realiza la conversión *USB/RS485*. El fabricante proporciona los *drivers* necesarios para que la conexión *USB* emule un puerto serie convencional. De este modo, desde el punto de vista del programador, el uso de este tipo de módulos se limita a enviar y recibir por un puerto serie las cadenas de caracteres que conforman los comandos.

La Tabla 16 muestra la relación de comandos suministrada por el fabricante para el módulo *i-7011*. Se trata de un conjunto de órdenes sencillas con las que es posible realizar una serie de operaciones de configuración, lectura de datos de entrada y actuación sobre las salidas. Dicho módulo dispone de una entrada analógica y dos salidas digitales, entre otras prestaciones, y se utiliza en el sistema desarrollado para el control de pH.

La Tabla 17 muestra la relación de comandos de los módulos de la gama *i-7017*, *i-7018*. Estos módulos comparten tabla de comandos porque a su vez comparten muchas características.

Command	Response	Description
%AANNTCCFF	!AA	Set Module Configuration
***	No Response	Synchronized Sampling
#AA	>(Data)	Read Analog Input
#AAN	>(Data)	Read Analog Input from channel N
\$AA0	!AA	Perform Span Calibration
\$AA1	!AA	Perform Zero Calibration
\$AA2	!AATCCFF	Read Configuration
\$AA3	>(Data)	Read CJC Temperature
\$AA4	>AAS(Data)	Read Synchronized Data
\$AA5VV	!AA	Set Channel Enable
\$AA6	!AAVV	Read Channel Status
\$AA8	!AAV	Read LED Configuration
\$AA8V	!AA	Set LED Configuration
\$AA9(Data)	!AA	Set CJC Offset Value
\$AAB	!AAS	T.C. Open Detection
\$AAF	!AA(Data)	Read Firmware Version

\$AAM	!AA(Data)	Read Module Name
\$AAZ(Data)	!AA	Send LED Data
~AAO(Data)	!AA	Set Module Name
~AAEV	!AA	Enable/Disable Calibration
@AADI	!AASOOI	Read Digital I/O and Alarm Status
@AADO(Data)	!AA	Set Digital Output
@AAEAT	!AA	Enable Alarm
@AAHI(Data)	!AA	Set High Alarm
@AALO(Data)	!AA	Set Low Alarm
@AADA	!AA	Disable Alarm
@AACA	!AA	Clear Latch Alarm
@AARH	!AA(Data)	Read High Alarm
@AARL	!AA(Data)	Read Low Alarm
@AARE	!AA(Data)	Read Event Counter
@AACE	!AA	Clear Event Counter

Tabla 16 Relación de comandos del módulo i-7011

General Command Sets		
Command	Response	Description
%AANNTCCFF	!AA	Set Module Configuration
***	No Response	Synchronized Sampling
#AA	>(Data)	Reads the Analog Inputs of All Channels
#AAN	>(Data)	Reads the Analog Input of the Specified Channel
\$AA0	!AA	Performs a Span Calibration
\$AA1	!AA	Performs a Zero Calibration
\$AA0Ci	!AA	Performs a Single Channel Zero calibration
\$AA1Ci	!AA	Performs a Single Channel Span calibration
\$AA2	!AANNTCCFF	Reads the Module Configuration
\$AA3	>(Data)	Reads the CJC Temperature
\$AA4	>AAS(Data)	Reads the Synchronized Data
\$AA5VV	!AA	Enables/Disables the Channel
\$AA6	!AAVV	Reads the Channel Enable/Disable Status
\$AA7CiRrr	!AA	Sets the Single Channel Range Configuration
\$AA8Ci	!AACiRrr	Reads the Single Channel Range Configuration
\$AA9	!AA(Data)	Reads the CJC Offset
\$AA9SNNNN	!AA	Sets the CJC Offset
\$AAA	>(data)	Reads the Analog Inputs of All Channels in Hex Format

Command	Response	Description
\$AAA	!AAi	Reads the CJC Update Setting
\$AAAi	!AA	Sets the CJC Update Setting
\$AAB	!AANN	Reads the Channel Diagnostic Status
\$AAF	!AA(Data)	Reads the Firmware Version
\$AAM	!AA(Data)	Reads the Module Name
\$AAP	!AASC	Reads the Protocol
\$AAPN	!AA	Sets the Protocol
\$AAS0	!AA	Internal Calibration
\$AAS1	!AA	Reloads the Default Calibration Parameters
~AAC	!AAN	Reads the CJC Enable/Disable
~AACN	!AA	Enables/Disables the CJC
~AAEV	!AA	Enables/Disables the Calibration
~AAI	!AA	Soft INIT
~AAO(Name)	!AA	Sets the Module Name
~AATnn	!AA	Sets the Soft INIT Timeout
~AAEE	!AAN	Reads the Open Wire Detection Enable/Disable
~AAEEN	!AA	Enable/Disable Open Wire Detection
@AAS	!AAN	Read connecting mode
@AASN	!AA	Set connecting mode to differential or single-ended

Tabla 17 Relación de comandos de los módulos i-7017, i-7018

Una de las características que resulta de más interés es que sus ocho entradas analógicas se conectan a un convertidor analógico-digital sigma-delta de 24 bits, con rango de entrada programable.

La diferencia entre el módulo *i-7017* y el módulo *i-7018* estriba en que el segundo modelo dispone de más niveles configurables de margen de entrada analógica. Como ya se ha indicado, el módulo *i-7017* se usa en el subsistema de control de presión.

II.2.1 Formato de los mensajes en la familia i-7000

La comunicación con todos los módulos de la familia *i-7000* es similar y responde al formato *DCON*, protocolo de comunicaciones propietario de la corporación *ICP DAS*. Los comandos son un conjunto de caracteres enviados por el ordenador y que responden a un mismo formato, generando respuestas similares del módulo.

Comando enviado por ordenador: (CABECERA)(DIR)(COM)[CHK](cr)
Respuesta del módulo: (CABECERA)(DIR)(DATOS)[CHK](cr)

CABECERA Se trata de un carácter que identifica el tipo de comando enviado y la naturaleza del mensaje de respuesta.

DIR Dirección que identifica al módulo. Es posible conectar hasta 32 módulos diferentes, enlazados todos dentro de un mismo bus *RS-485*.

COM Orden enviada por el ordenador al módulo. Puede estar conformada por uno, varios o ningún carácter, según se aprecia en las tablas de comando expuestas anteriormente.

DATOS Información que devuelve el módulo al ordenador y que forma parte de la *respuesta*.

CHK De forma opcional, los mensajes transmitidos en uno y otro sentido, pueden finalizar con un *checksum* (código de control de errores) similar al descrito en el intercambio de mensajes entre el ordenador y el equipo *Biostat*.

cr Todos los mensajes terminan con el carácter 13, que en codificación ASCII se corresponde con el código *carry return*, usado para identificar el fin de mensaje.

II.3 INTERFAZ CON BALANZA SARTORIUS-QUINTIX

II.3.1 Interfaz Sartorius

Las balanzas de precisión de la empresa Sartorius dotadas de interfaz *USB* están configuradas por defecto para que cuando se conectan al ordenador, éste las reconoce como un teclado adicional, de modo que el usuario solo tiene que abrir un archivo de texto o una hoja de datos, por ejemplo, y cada vez que pulsa sobre la tecla de imprimir de la balanza, la ventana activa en el ordenador recibe la información enviada por la balanza en un formato configurable. Esta información puede ser una lectura de peso, un promedio, un resultado estadístico, etc.

Format	Command	Action/Function	Comments
1	ESC P	Print	Corresp. to menu, with/ without stability
1	ESC T	Tare or zero	
1	ESC K	Filter "Very stable conditions"	
1	ESC L	Filter "Stable conditions"	Corresp. to menu, stable
1	ESC M	Filter "Unstable conditions"	Corresp. to menu, unstable
1	ESC N	Filter "Very unstable conditions"	
1	ESC O	Lock keys	
1	ESC Q	Acoustic signal	
1	ESC R	Unlock keys	
1	ESC S	Restart	
1	ESC Z	Internal calibration/adjustment	Depending on menu and model
1	ESC U	Tare	
1	ESC V	Zero	
1	ESC W	Ext. adjustment with standard weight (not available for verified models)	Depending on menu
2	ESC kP_	Print as with Print button	
2	ESC s3_	Go back, exit, cancel	
2	ESC x1_	Print balance type	
2	ESC x2_	Print serial number	
2	ESC x3_	Print balance software version	
2	ESC x4_	Print software version of display and control unit	
2	ESC x5_	Print user/device ID	

Tabla 18 Comandos del interfaz con balanza Sartorius

Desde el punto de vista de un proceso automatizado en el que interesa registrar el peso de salida de producto filtrado de un reactor, estas utilidades descritas no resultan de interés. La alternativa es instalar un *driver* específico, proporcionado por el fabricante, merced al cual el ordenador reconoce la conexión *USB* como un puerto serie convencional. De este modo, el instrumento se comporta como un dispositivo estándar *RS-232*, al cual se puede enviar comandos y leer la respuesta generada.

La Tabla 18 muestra los comandos que admiten los diversos tipos de balanzas analíticas fabricadas por Sartorius. Se han realizado pruebas en el laboratorio y se ha concluido que el comando que aporta más utilidad es el siguiente:

ESC kP_

Se trata de un comando formado por cuatro caracteres: el carácter 27, que se corresponde con el código ASCII de *escape*, y la secuencia “kP_”. Es opcional el envío de algún carácter para finalizar la cadena, como por ejemplo el código 10 (*line feed*) o el código 13 (*carry return*).

Como consecuencia de transmitir el código indicado por el puerto serie asociado a la conexión *USB* se recibe de la balanza una cadena de caracteres, cuyo formato es configurable desde el menú de la propia balanza, y que contiene el peso realizado medido en gramos.

II.3.2 Configuración recomendada

Sub-menú “*USB port*”:

Opción *Device/Protocol* → Seleccionar *PC – SBI*

Sub-menú “*Printout*”:

Opción *Printout* → Seleccionar *Manual*

Opción *Manual print format* → Seleccionar *Only Value*

Los datos recibidos con esta configuración están conformados por cadenas de 22 caracteres, tal como se muestra en la Tabla 19. Después de un comando de impresión, se recibe una cadena similar a la que se muestra en el ejemplo de la citada figura.

La cadena recibida de caracteres está formada por una letra, que identifica si la pesada ha sido precedida de un *autocero* (letra *N*) o de un *autotarado* (letra *G*), un número de hasta cuatro cifras enteras y dos decimales separados por un punto y precedido de su correspondiente signo de polaridad (más o menos), la letra *g* que indica la unidad de medida y los caracteres de fin de mensaje. Para completar los 22 caracteres se insertan espacios entre las partes citadas.

Normal Operation																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
K	K	K	K	K	K	+	A	A	A	A	A	A	A	A	A	*	E	E	E	CR	LF
*	*	*	*	*	*	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	*	*	*		
						*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						

K	ID code character	CR	Carriage return
*	Space	LF	Line feed
A	Displayed characters	E	Measurement unit symbol

Example:																					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
N						+				1	2	3	.	5	6	*	g	*	*	CR	LF

Tabla 19 Formato de datos recibidos de la balanza

II.4 CONEXIONES

Se han dispuesto conectores DIN roscados de seguridad para realizar las conexiones. Se han empleado conectores machos para chasis, y conectores hembra aéreos (Figura 107).



Figura 107 Tipo de conectores empleados

Dependiendo del uso que se les va a dar se ha dispuesto varios modelos distintos, diferenciados por el número de terminales, para evitar confusiones en la conexión de los mismos.

Los diagramas expuestos en las figuras posteriores están referenciados a conectores roscados a chasis, vistos frontalmente.

II.4.1 Conector para Bus RS-485

Para facilitar las conexiones de las señales RS-485 se usa conector de cuatro terminales. En la Figura 108 se muestran las conexiones. El estándar RS485 establece una conexión a dos hilos. Los dos pines de alimentación no son necesarios, se han dispuesto previendo la posibilidad de alimentar un posible dispositivo adicional en futuras ampliaciones.

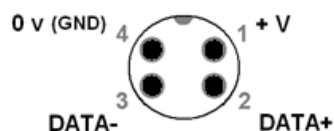


Figura 108 Conexión del Bus 485

II.4.2 Conector para sensor de presión

Se usa un conector de cinco terminales, en ángulo de 270° (Figura 109) para facilitar la conexión entre la caja de interfaces y medida de presión con la caja que contiene el amplificador de instrumentación y el sensor de presión. Hay dos conectores para el caso en que se desee usar un segundo sensor.

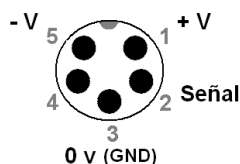


Figura 109 Conexión de sensor

II.4.3 Conector para alimentación 24 V

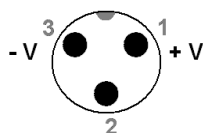


Figura 110 Conexión de 24 V

En las primeras pruebas, previas a la redacción definitiva, se contempló la posibilidad de emplear electroválvulas para el control de flujos en los circuitos hidráulicos y cuya tensión de trabajo es de 24 V_{DC}. Aunque posteriormente se descartó el empleo de estos dispositivos, se ha decidido mantener esta conexión para alimentar el dispositivo de medida Endress acoplado al reactor tubular y/o para futuras ampliaciones que requieran de 24 voltios.

ANEXO III: ALGORITMOS DE REGULACIÓN

El modo más simple de controlar un proceso consiste en aplicar una determinada señal de entrada a un sistema de control, que a su vez genera una salida. Un ejemplo de control simple lo constituye el accionamiento manual de un dispositivo de dosificación, como el mostrado en la Figura 111.



Figura 111 Ejemplo de control simple

La entrada de este sistema de control es la acción que el usuario realiza haciendo clic sobre un elemento de un panel, en pantalla. El sistema procesa esta entrada y genera una salida consistente en un código que activa o desactiva la bomba dosificadora de ácido. Este sistema simple no permite regular la salida de forma que sea posible controlar con precisión la cantidad de ácido dosificado.

Para que el sistema pueda regular la salida es necesario incluir un elemento de realimentación, tal como se muestra en la Figura 112, que muestra un sistema básico de control denominado comúnmente de lazo cerrado.

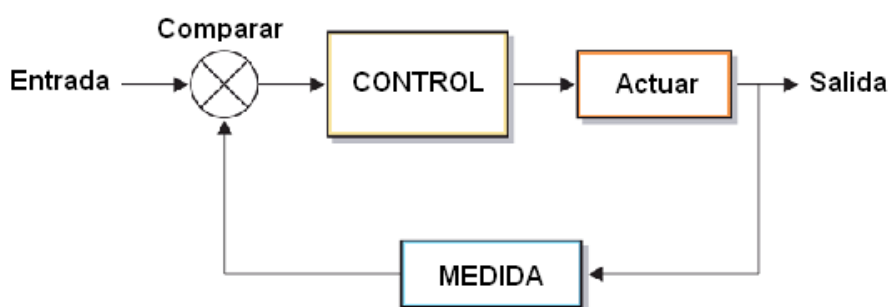


Figura 112 Representación esquemática de un sistema de control básico

Un ejemplo de sistema básico de control de lazo cerrado es una aplicación cuya entrada es el valor de pH final que se desea y el elemento de realimentación es el valor proporcionado por un electrodo (medida de pH). El sistema de control compara la medida realizada con el valor de entrada y en base a esta comparación envía el correspondiente comando al elemento actuador. En este caso la salida del sistema es la orden que activa o desactiva la bomba

dosificadora de ácido. Este sistema de control es más preciso que el control simple ilustrado con la Figura 111, pero sigue siendo insuficiente pues no contempla regular un caudal ni tiene en cuenta los errores inherentes a la precisión del sistema de actuación y sistema de medida. Se hace evidente la necesidad de complementar el sistema de control con algoritmos tales que corrijan estas deficiencias.

En el subcapítulo 5.1 de esta Memoria se describen los algoritmos implementados en las aplicaciones desarrolladas. En el apartado siguiente se realiza una descripción general de los algoritmos *PID*, por ser este el tipo de control que utilizan los subsistemas del equipo *Biostat*. En el segundo apartado de este anexo se describe una posible aplicación de algoritmo basado en lógica difusa para implementar el control de presión en los conductos hidráulicos.

III.1 ALGORITMO *PID*

Como ya se ha comentado, un sistema de control realimentado (Figura 112) dispone de una entrada que se compara con la salida. Se suele denominar *error* al resultado de esa comparación. Por lo tanto, el *error* de un sistema es un indicador de la desviación entre el valor medido y el valor que se quiere obtener. Un sistema que implementa un *control proporcional* es el que tiene en cuenta cómo de grande es el error a la hora de actuar.

$$y(t) = K_p e(t) \quad (30)$$

En la ecuación (30), $y(t)$ es la función de salida del controlador y $e(t)$ es la función de error.

En un sistema que implemente un *control derivativo* el cambio en la salida del controlador es proporcional a la variación con el tiempo de la señal de error.

$$y(t) = K_D \frac{de}{dt} \quad (31)$$

El *control integral* se caracteriza porque la velocidad de cambio de la salida es proporcional a la señal de error.

$$\frac{dy}{dt} = K_I e(t) \rightarrow y(t) = \int K_I e \cdot dt = K_I \int e \cdot dt \quad (32)$$

Un control *PID* es un mecanismo de control por realimentación que combina los tres modos de control citados: proporcional, derivativo e integral.

La Figura 113 muestra un ejemplo de algoritmo *PID* a nivel de bloques. La acción proporcional determina la reacción del error actual. La acción integral genera una corrección proporcional a la integral del error, asegurando con esto que aplicando un esfuerzo de control suficiente, el error de seguimiento se reduce a cero. La acción derivativa determina la reacción del tiempo en el que el error se produce.

En este tipo de controles hay que ajustar las tres variables del algoritmo, K_P , K_D y K_I , para poder adaptar el funcionamiento del sistema de control a las especificaciones del proceso que se desea regular. Se usa el término de *sintonización* para referirse al proceso que permite seleccionar los mejores ajustes.

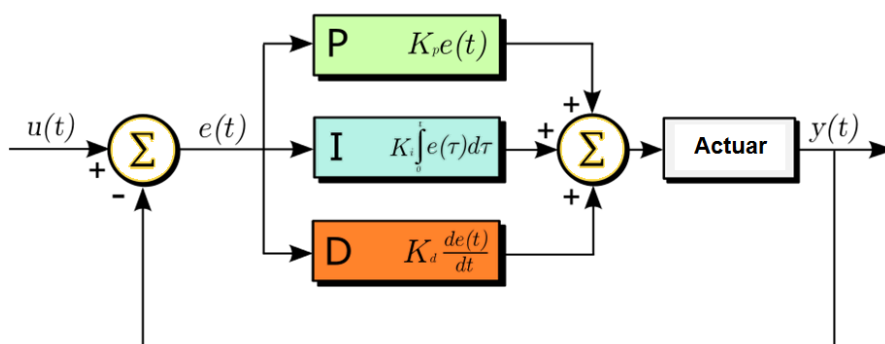


Figura 113 Algoritmo de control PID

Hay que hacer constar que el uso de un controlador *PID* no siempre garantiza control óptimo del sistema o la estabilidad del mismo.

Un controlador puede ser llamado también proporcional-integral (*PI*), proporcional diferencial (*PD*), proporcional (*P*) o integral (*I*) en la ausencia de las acciones de control respectivas.

III.2 CONTROL DIFUSO PARA REGULAR LA PRESIÓN

Haciendo uso de las funciones *ActiveX* que proporciona *CVI* se pueden desarrollar aplicaciones que enlazan con funciones desarrolladas con *Matlab* y que permiten realizar un control de presión aplicando un control difuso.

El uso de *Matlab* aporta simplicidad a la programación de controles difusos, ya que ofrece herramientas basadas en interfaces gráficas de usuario (Figura 114) que permiten definir fácilmente las entradas y salidas del sistema de control, así como las reglas que definen las relaciones entre las salidas y las entradas.

El diseño propuesto para controlar la presión en los circuitos hidráulicos del prototipo simulador consta de dos entradas y una salida. Una entrada denominada *consigna* se corresponde con la diferencia entre el valor de presión medido en el circuito de retorno y el valor de presión que se desea tener. La segunda entrada, denominada *difCaudales*, se obtiene como la diferencia entre los caudales movidos por las bombas de impulsión y de retorno. Los caudales de cada bomba se regulan variando su ciclo de trabajo, por tanto se trata de parámetros que varían entre 0 (bomba parada) y 100 (bomba moviendo su máximo caudal). Por consiguiente, la entrada *difCaudales* varía entre el valor 100 (bomba de

impulsión al máximo de caudal y bomba de retorno parada) y el valor -100 (bomba de impulsión parada y bomba de retorno al máximo de caudal). El valor 0 indica que ambas bombas tienen el mismo caudal.

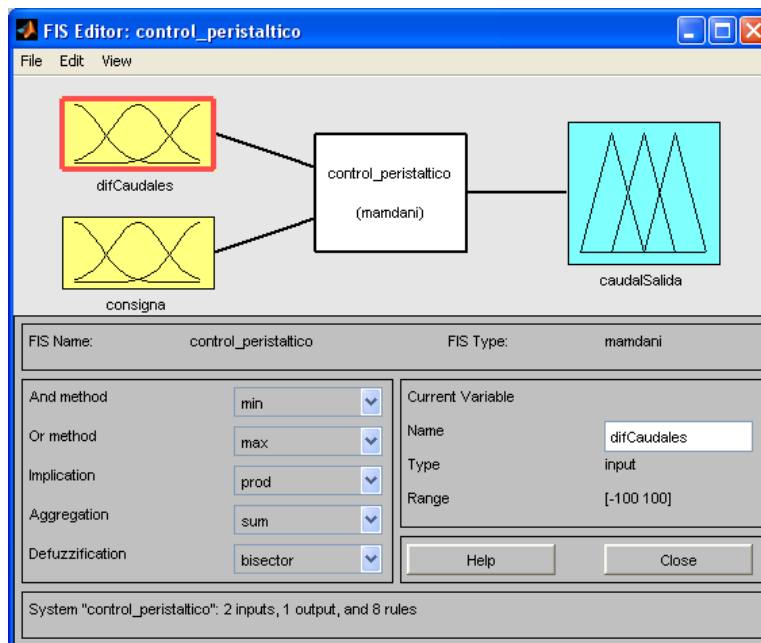


Figura 114 Control difuso. Editor de archivos *.fis

La salida del control se denomina *caudalSalida* y devuelve la nueva diferencia que debe guardar el caudal de la bomba de impulsión con respecto al caudal de la bomba de retorno (expresados ambos caudales como porcentajes de ciclo de trabajo).

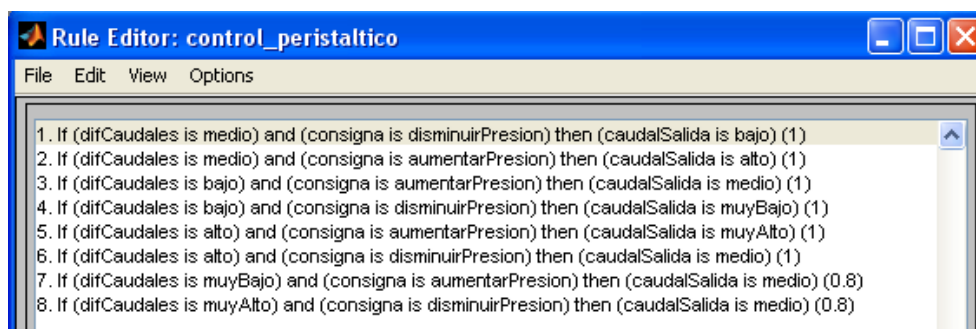


Figura 115 Control difuso. Reglas de diseño

En la Figura 115 se muestran las reglas y en la Figura 116 se muestran los términos que cubren el universo de discurso de cada variable a la vez que se aprecia el tipo de función empleado.

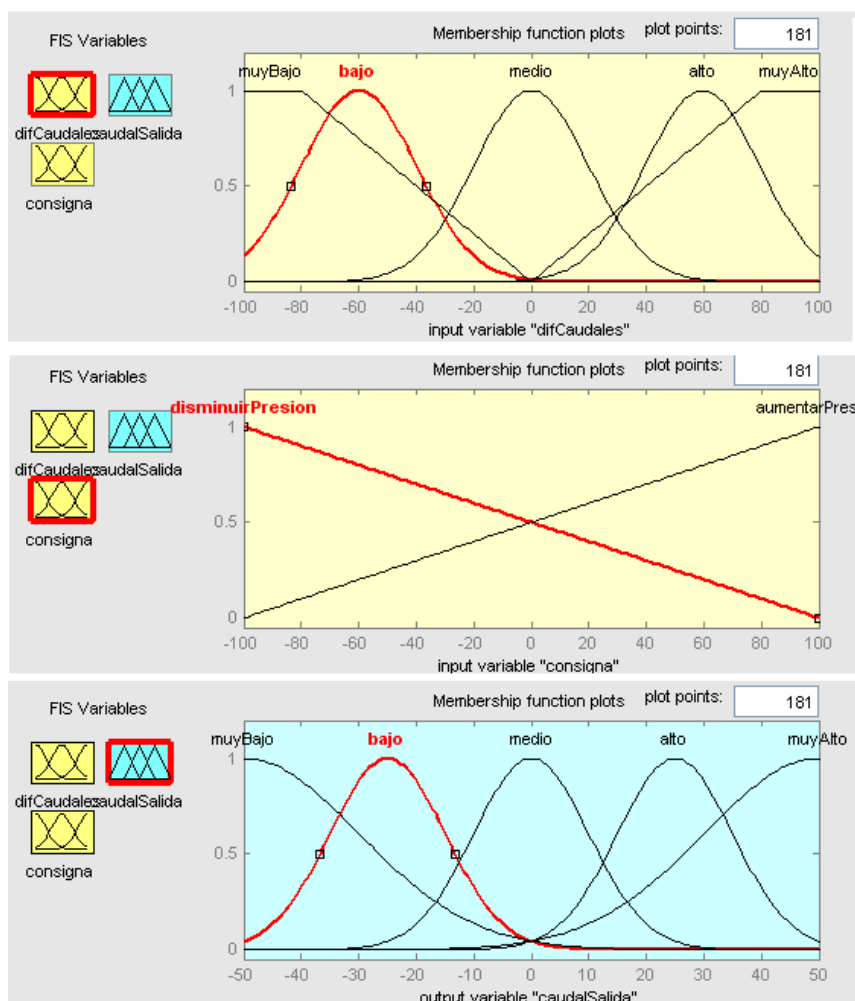


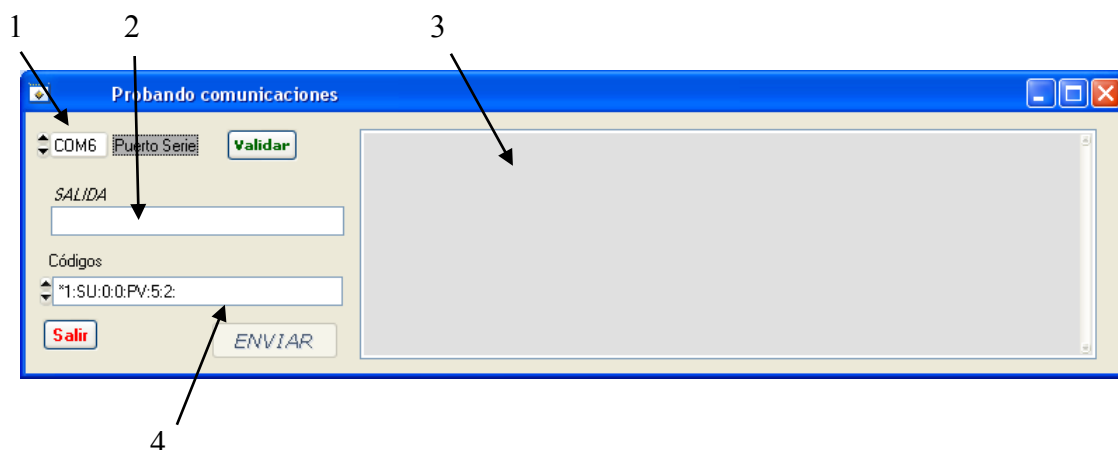
Figura 116 Conjuntos difusos y relaciones de pertenencia

El uso de este tipo de controles aporta algunas ventajas con respecto a otros algoritmos similares. No necesita el uso de coeficientes (como sucede en controles *PID*). No hay variaciones bruscas de caudales y en pruebas realizadas se ha podido comprobar que el sistema se autoajusta partiendo desde diferentes condiciones de inicio. Además se adapta mejor a los cambios debidos a las reacciones químicas, variaciones de concentración o posibles modificaciones del valor de consigna.

ANEXO IV: MANUALES DE USUARIO DE LOS PROGRAMAS DESARROLLADOS

Programa **COMUNICA**

Programa creado para probar las comunicaciones entre el ordenador y el sistema *Biostat*. Ha sido compilado con *CVI*, versión 9.0.



Elementos principales del panel de interfaz:

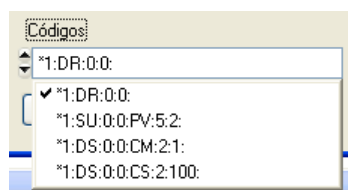
- 1 - Selector de puerto serie.
- 2 - Texto de salida.
- 3 - Ventana de respuestas.
- 4 - Selector de comandos.

Funcionamiento.

Al ejecutarse el programa, se muestra al usuario el panel de la figura anterior. Previamente se ha realizado un chequeo de los puertos serie disponibles en el ordenador. La primera acción a realizar es seleccionar el canal serie (1) que comunica con el equipo *Biostat*. Pulsando sobre el botón **Validar** se inicializa el puerto serie seleccionado.

Del selector (4) se puede elegir un comando a enviar. Dicho comando se muestra en la ventana (2) de salida. El texto mostrado en esta ventana se puede editar. Al pulsar sobre el botón **ENVIAR** el programa termina de conformar el mensaje calculando el “checksum” y lo envía por el puerto serie.

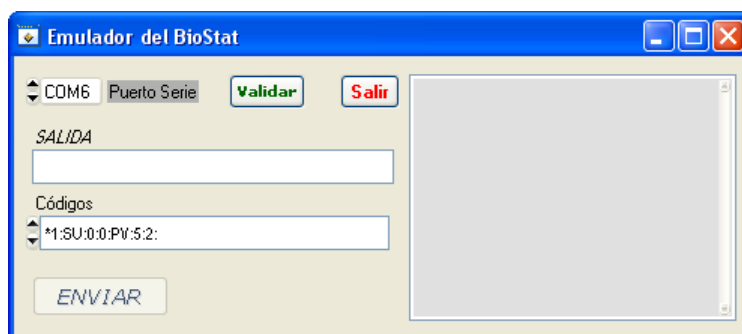
En la ventana de respuestas (3) se muestran los datos recibidos por el canal seleccionado.



El selector de códigos (4) incluye los comandos de uso más frecuentes. Una vez seleccionado el código adecuado, es fácil después modificar el control o el parámetro en la ventana de salida (2) antes de proceder a su envío al equipo *Biostat*.

El programa finaliza pulsando sobre el botón **Salir** o cerrando la ventana, como cualquier otro programa *Windows*.

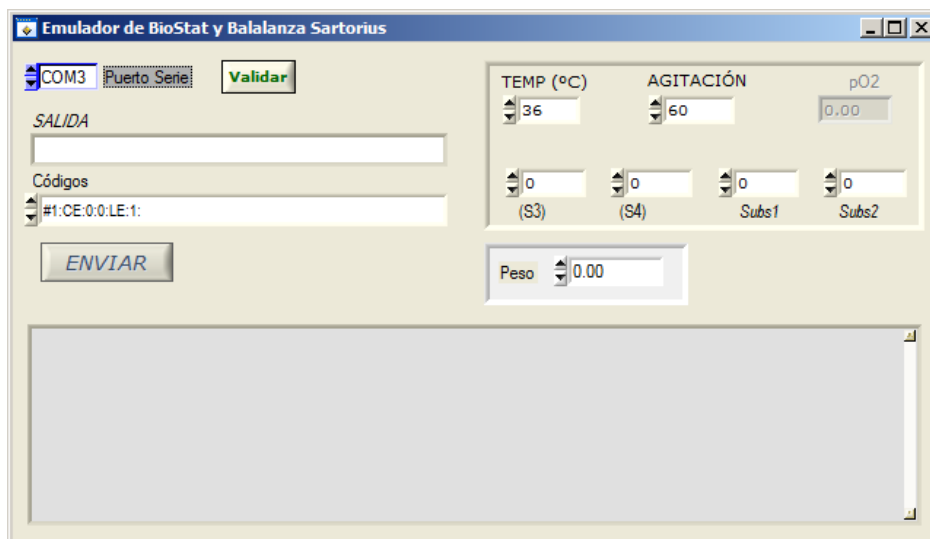
Programa **COMUNICATOR**



Se trata de un programa similar al descrito anteriormente, también desarrollado con *CVI*, y que ha sido diseñado para emular el funcionamiento del equipo *Biostat*.

Se han programado una serie de respuestas similares a las que proporciona el equipo real y de este modo se ha facilitado el desarrollo de aplicaciones de control del equipo, sin necesidad de hacer uso del mismo.

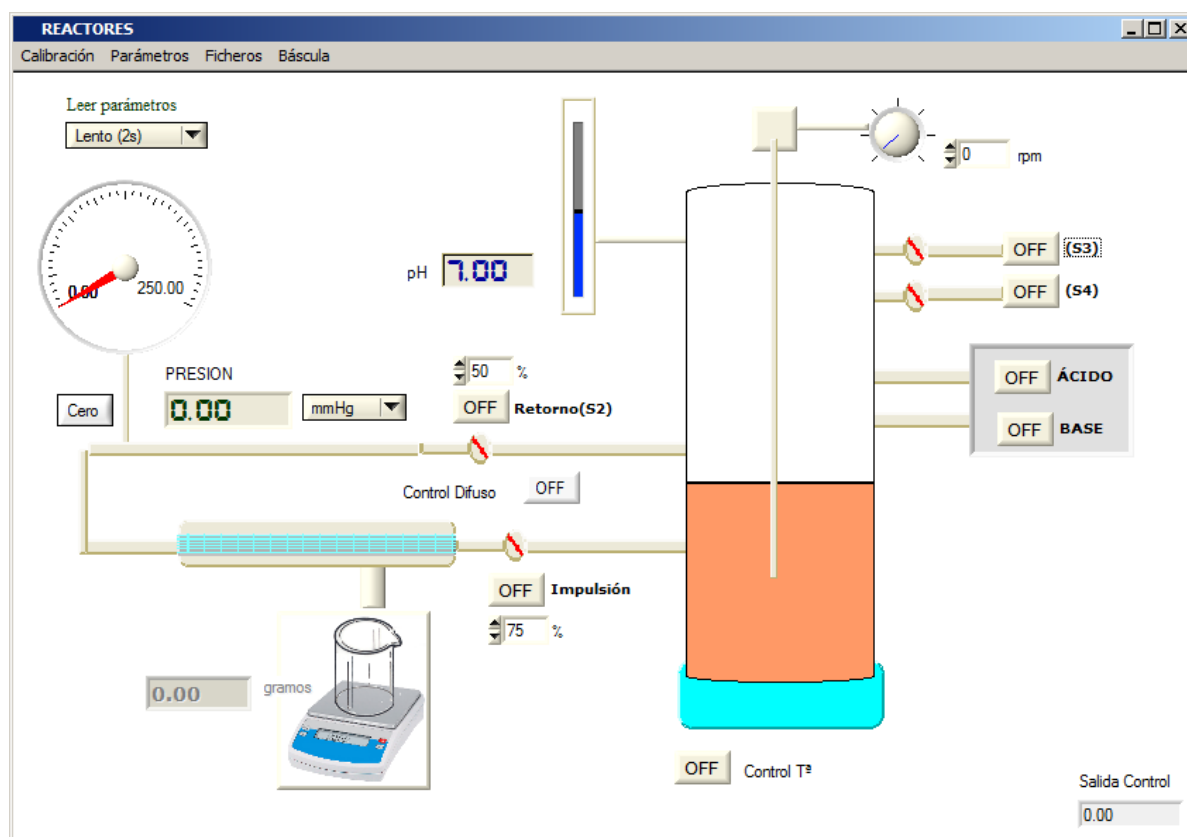
Versión 2.



Se ha desarrollado una segunda versión de este mismo programa que detecta el tipo de mensaje de comando recibido, y en caso de responder al formato empleado por la balanza conforma una respuesta similar a la que generaría dicho equipo, a partir del valor de peso introducido en pantalla.

Los programas de simulación facilitan en gran medida el desarrollo de programas de control, pues es posible realizar pruebas de comunicación y simulaciones de proceso de datos durante la depuración del programa. Se reduce así el tiempo de experimentación con el equipo real, y se evitan acciones erróneas sobre el equipo durante la fase de pruebas, que a veces pueden ser motivos de fallos y averías.

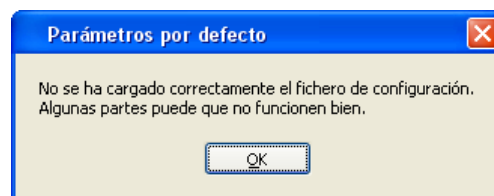
Programa **REACTORES**



Se trata de una utilidad para realizar diagnósticos, configurar el sistema, calibrar dispositivos y ajuste de coeficientes. Genera un fichero *Excel* de configuración que será usado por otras aplicaciones.

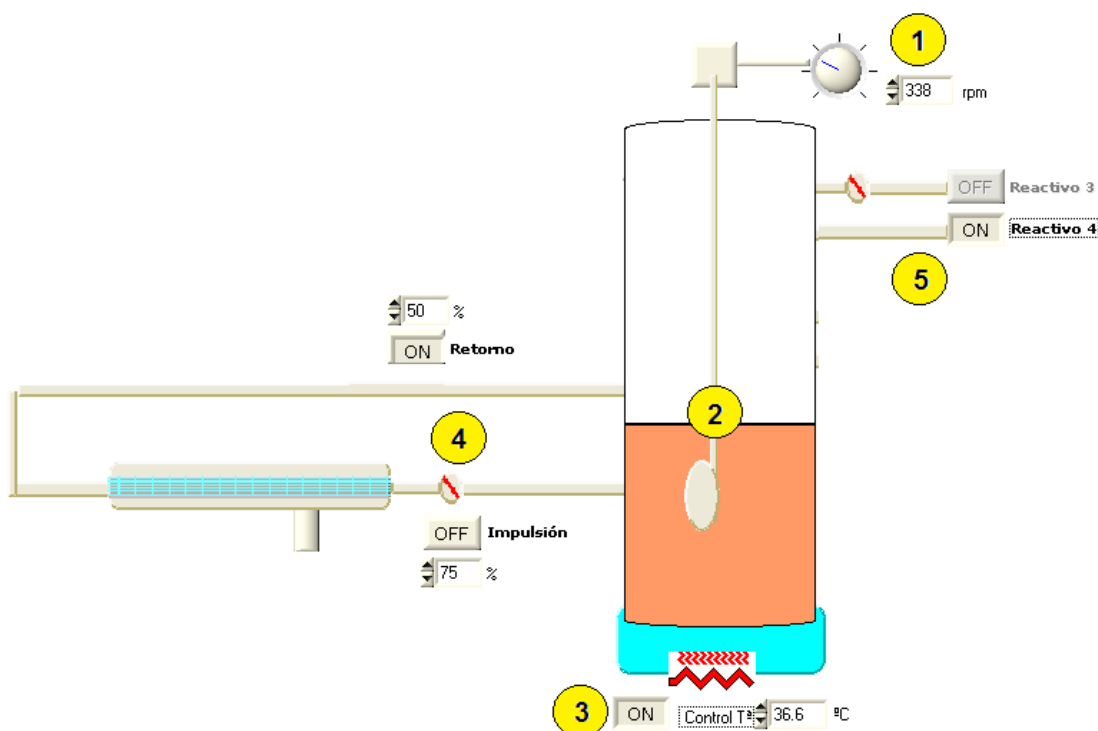
Cuando se ejecuta el programa, se realiza un chequeo de los puertos serie disponibles en el ordenador. Es por ello que puede tardar unos segundos en aparecer el panel principal. También puede ocurrir que el movimiento del ratón durante este chequeo inicial ralentice la ejecución inicial del programa.

La siguiente acción consiste en mostrar una ventana de selección de fichero de configuración. Seleccionar el fichero *Excel* de configuración. En caso de cerrar la ventana sin realizar la selección adecuada, se mostrará el mensaje de la figura derecha.



Si se detectase un fallo en la comunicación con alguno de los puertos empleados se genera el correspondiente mensaje de error y se deshabilita el uso del subsistema relacionado con dicho puerto.

Controles del sistema *Biostat*.



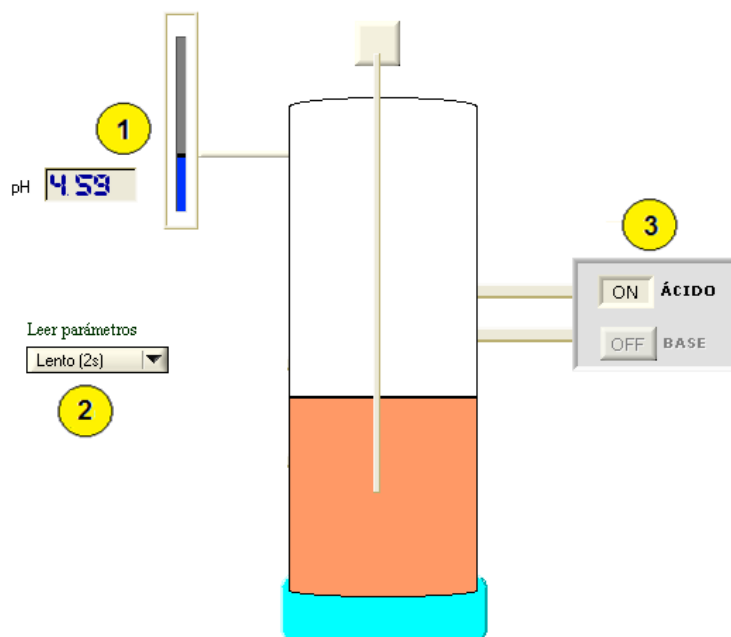
(1) Agitador. Actuando sobre el dial o bien introduciendo directamente el valor numérico de revoluciones por minuto, se pone en marcha el motor que mueve la turbina en el vaso del reactor. Una animación (2) simula dicha rotación en pantalla. El sistema se detiene asignando un valor de rotación inferior a 50 rpm.

(3) Temperatura. Este botón pone en marcha o detiene el sistema de control de temperatura. El valor numérico se puede variar entre 10 y 100 grados centígrados. En el fichero de salvaguarda de parámetros de configuración se almacena el valor de temperatura que marque este control en el momento de crear o actualizar dicho fichero. Una animación simple en pantalla sirve para indicar si el control está activo o deshabilitado.

(4) Bombas S1 y S2. En la figura usada como ejemplo, el control de S1 se muestra con rótulo de “Impulsión” y el control de S2 se muestra con el rótulo de “Retorno”. Posteriormente se verá como modificar dichos nombres. Observar que dichos controles tienen asociados una entrada numérica para poder cambiar el ciclo de trabajo de bomba.

(5) Bombas S3 y S4. En el ejemplo mostrado, se usan los nombres de “Reactivo3” y “Reactivo4” para designar los botones que actúan sobre el control de las bombas S3 y S4, respectivamente. Estos dispositivos son excluyentes. Funciona uno u otro, nunca ambos simultáneamente. Es por ello que cuando se activa uno, el programa deshabilita la posibilidad de actuar sobre el otro control.

Medida de pH y actuación sobre bombas de ácido y base.

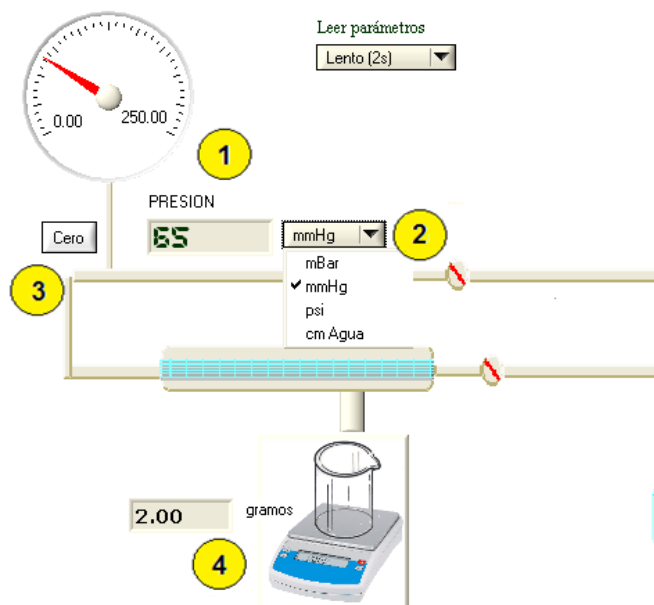


(1) Medida de pH. Se indica con un valor numérico y se combina con una barra de desplazamiento.

(2) *Leer parámetros*. Al actuar sobre este control se despliega un selector con el que se elige el tiempo entre intervalos de lectura. Las opciones disponibles son: *Rápido (0,5 s)*, *Normal (1s)*, *Lento (2s)* (valor por defecto) e *Inactivo*. Esta última opción detiene la adquisición de datos.

(3) Botones para dosificar ácido o base. El software no permite dosificar ambos simultáneamente.

Medida de presión y peso.



Las lecturas de presión también se realizan según la elección realizada con el selector *Leer parámetros* al igual que la medida de pH.

(1) Indicador numérico combinado con dial, para visualizar la presión. Por defecto se mide en mmHg.

(2) Selector para cambiar la unidad de medida.

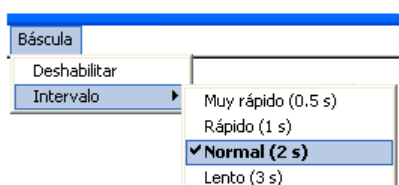
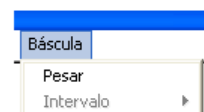
(3) Botón de autocero. Toma como valor cero el valor de tensión leído en el instante de pulsar dicho botón.

(4) Medida de peso, en gramos. Los parámetros relacionados con esta medida se modifican desde la opción de menú “báscula”.

Menú “Báscula”.

Por defecto el control de la balanza está deshabilitado. Para poder activarlo, hay que pulsar sobre la opción “Pesar”.

Se vuelve a este estado automáticamente si se detecta un error en la comunicación con el puerto serie asociado a la balanza.

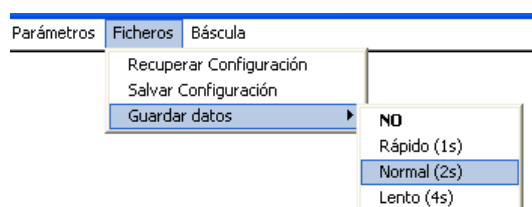


Al habilitar el control, cambian las opciones de menú, pudiendo elegir el intervalo entre lecturas de medida. También se ofrece la posibilidad de deshabilitar el control.

Menú “Ficheros”.

La opción de “Recuperar Configuración” permite leer un nuevo fichero *Excel* de configuración. El proceso es idéntico al que ocurre durante el inicio del programa.

La opción “Salvar Configuración” crea un fichero *Excel* de configuración con los parámetros actuales. Para que dicha operación se ejecute correctamente, es necesario que en el directorio de trabajo se encuentre presente el fichero patrón de referencia “cnf.xls”. Aparecerá una ventana de diálogo solicitando un nombre para el nuevo fichero y un destino para ubicarlo. Dicha ventana permite crear directorios. Es posible que en algún momento solicite confirmar una operación de sobre-escritura. En tal caso hay que contestar afirmativamente. Si en algún momento se cancela, o se introduce un nombre de fichero incorrecto, se genera de todas formas un fichero de configuración, en el directorio de trabajo por defecto, cuyo nombre se crea a partir de la fecha y hora que marca el sistema.



La opción “Guardar datos” genera un fichero de texto, con extensión “*.txt” y nombre generado a partir de la fecha y hora del sistema, en el que se almacenan una serie de filas con los siguientes campos, separados por signos de punto y coma:

Num - Número de orden)

Tiempo - Segundos entre la creación de una fila y la siguiente. La columna que se crea sirve para usarla como eje de abscisas en una representación gráfica.

%S1 – Valor del porcentaje que indica el ciclo de trabajo de la bomba S1.

%S2 – Valor del porcentaje que indica el ciclo de trabajo de la bomba S2.

pH – Valor promediado de pH.

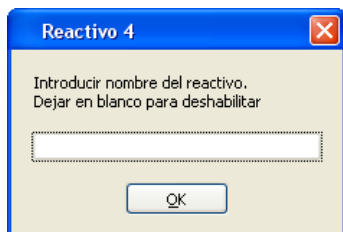
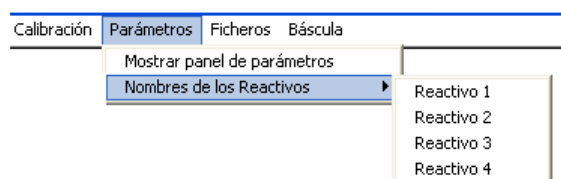
Bombas – Número que indica si está activa la bomba de ácido (1), la bomba de base (2) o ninguna (0).

Peso – Valor en gramos.

Presión – Valor medido sin promediar, en mmHg.

Menú “Parámetros”.

La opción “Nombres de los Reactivos” permite asignar un nombre que identifique el reactivo dosificado o la función realizada por cada una de las cuatro bombas de que consta el sistema *Biostat*.



Al pulsar sobre una de las opciones aparece un cuadro de diálogo similar al mostrado.

Se admite un máximo de 10 caracteres. El nombre introducido se guarda en la tabla de datos relacionada con el fichero de configuración.

Dejando el cuadro en blanco se deshabilita el uso del control relacionado con el elemento dosificador seleccionado.

La opción “Mostrar panel de parámetros” presenta en pantalla un nuevo panel en el que se pueden modificar los parámetros de configuración del sistema.

(1) Para la comunicación con el equipo *Biostat* se requiere identificar el puerto serie asociado con el convertidor a RS-422 y ajustar la velocidad de transmisión.

(2) La velocidad de transferencia del puerto usado para comunicar el ordenador con la balanza está fijada a 9600 baudios, por tanto solo se necesita configurar el puerto serie.

(3) Los parámetros relacionados con el sistema de adquisición de datos son:

- Puerto serie asociado al convertidor a RS-485.
- Dirección del módulo i-7011 usado para medidas de pH.
- Rango de medida del citado módulo.
- Dirección del módulo usado para medir presión.
- Canal analógico empleado por el sensor de presión.
- Rango de medida de dicho módulo.
- Velocidad de transmisión de los módulos. (La misma para ambos módulos).



(4) Pulsando sobre el icono mostrado se abre una ventana del explorador de archivos que

permite seleccionar un directorio de trabajo. Está contemplada la posibilidad de crear nuevos directorios. La selección resultante es mostrada en la línea inferior del panel.

(5) Al cerrar el panel se guardan todos los cambios realizados en la tabla de parámetros. Esta tabla se vuelca al fichero de configuración cada vez que se da la orden pertinente desde la correspondiente opción del menú de “Ficheros”.

Menú “Calibración”.

Las opciones de este menú permiten calibrar el volumen dosificado por unidad de tiempo de las bombas peristálticas, ya sean controladas por el sistema *Biostat* o por módulo ICP-CON. En todos los casos están contempladas dos modalidades de dosificación:



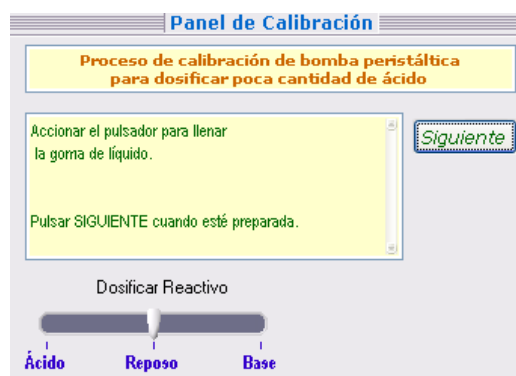
- **Tiempo Breve:** Durante determinadas dosificaciones el tiempo de funcionamiento de la bomba peristáltica es muy corto.
- **Tiempo Largo:** Se estima que la bomba peristáltica va a dosificar reactivo durante más de dos segundos seguidos.

Los procesos de calibración son idénticos para la bomba de ácido y la bomba de base, siendo éstas controladas por módulo ICP-CON. Igualmente, salvo el tiempo empleado en el proceso, no hay diferencia entre la calibración de “tiempo breve” y la calibración durante “tiempo largo”. Es por eso que solo se va a describir, a modo de ejemplo, un proceso de calibración.

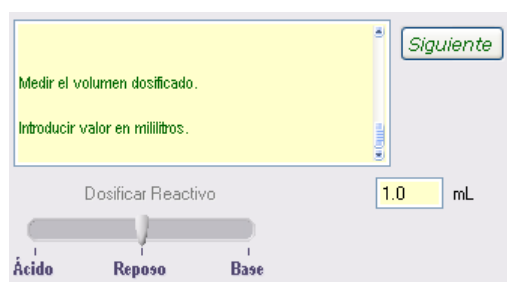
CALIBRACIÓN DE BOMBA DE ÁCIDO. TIEMPO BREVE.

Al marcar la opción del submenú se muestra en pantalla el **Panel de Calibración**. En dicho panel se aprecia un recuadro de texto donde se informa de las acciones a realizar.

Conviene, como paso previo al proceso de calibración, llenar las gomas de entrada/salida de ácido de la bomba peristáltica. Es por ello que se muestra en la parte inferior del panel un control con el que poder accionar manualmente la bomba adecuada.



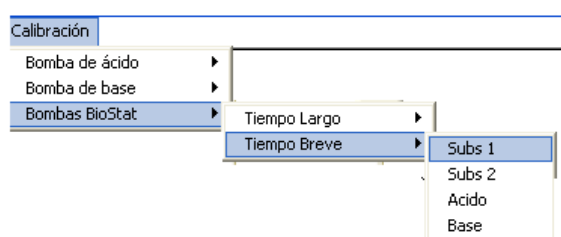
Una vez pulsado el botón de *Siguiete* se observa cómo dicho control se deshabilita. Introducir la goma de salida de ácido en un vaso o probeta vacío. Se realizarán diez dosificaciones consecutivas de forma automática. El control de la parte inferior de la ventana cambiará se moverá solo; de este modo se puede comprobar que la ejecución del programa se está desarrollando correctamente.



Es importante medir con la máxima exactitud posible el volumen dosificado e introducir dicho valor en el control numérico.

En cualquier caso, en caso de duda, hay que seguir las instrucciones que se indican por pantalla.

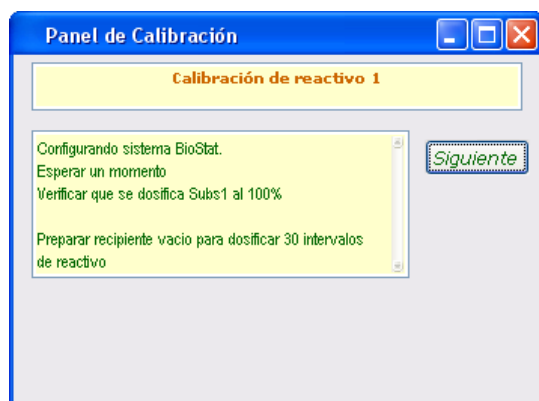
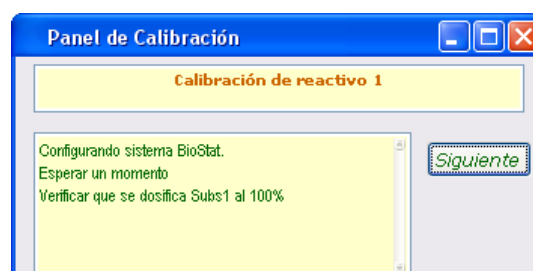
CALIBRACIÓN DE BOMBA DEL REACTIVO 1 DEL SISTEMA *BIOSTAT*. TIEMPO BREVE.



A modo de ejemplo, se va a describir el proceso de calibración de un reactivo controlado por el sistema *Biostat*. El resto de reactivos se calibran de forma similar. En cualquier caso, se recomienda seguir las indicaciones que se muestran por pantalla.

Al activar la opción de submenú, se pone en funcionamiento la bomba peristáltica que dosifica el reactivo a calibrar. Con esta acción se buscan dos objetivos: por un lado, llenar las gomas de líquido, en el caso de que no lo estuvieran, y por otro, verificar que se está empleando el control adecuado.

La bomba peristáltica debe funcionar en modo continuo. De no ser así, se puede haber producido un error en la comunicación. Se recomienda cerrar la ventana de calibración y realizar un diagnóstico del sistema.

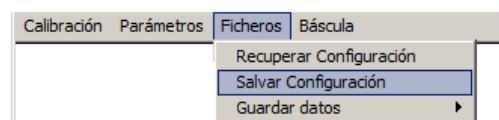


Al pulsar el control *Siguiente* se solicita preparar un recipiente vacío (o con una cantidad conocida de líquido) sobre el que se va a realizar un conjunto de dosificaciones consecutivas.

Al volver a pulsar *Siguiente* se realizan las citadas dosificaciones. Este proceso puede durar varios minutos y durante este tiempo el programa no responde a eventos externos introducidos por teclado o por ratón.

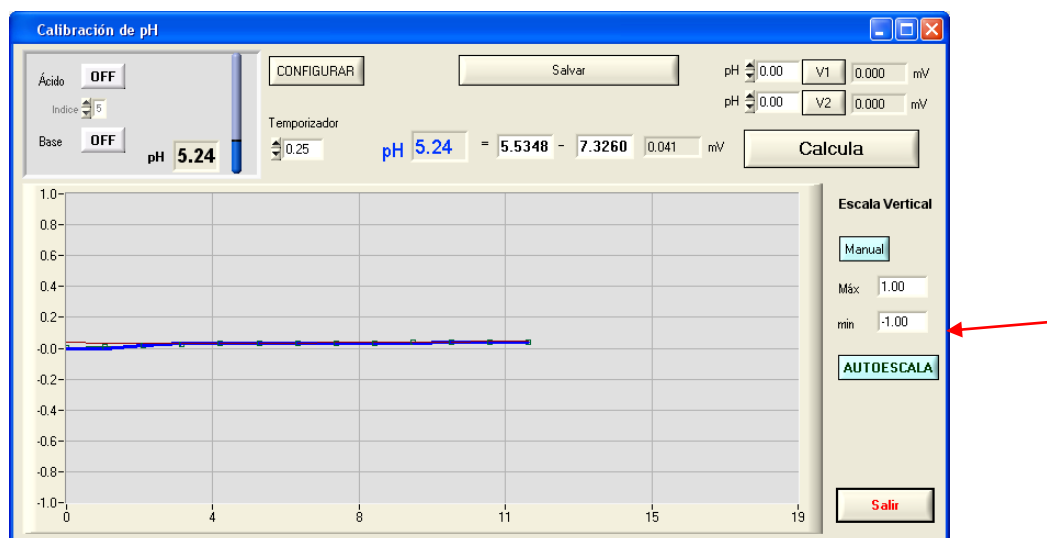
Una vez concluidas las dosificaciones, procede medir el volumen del líquido contenido en el recipiente e introducir la cantidad dosificada (recordar que se emplea la unidad de mililitros). Al pulsar una vez más el comando *Siguiente* el programa calcula el coeficiente asociado al control.

!!!! IMPORTANTE: DESPUÉS DE
REALIZAR UN PROCESO DE CALIBRACIÓN HAY
QUE SALVAR LA CONFIGURACIÓN, PARA
GUARDAR LOS NUEVOS COEFICIENTES OBTENIDOS.

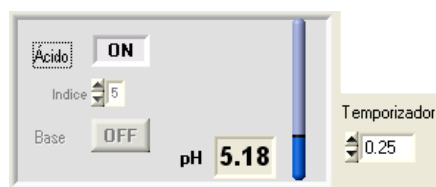


Programa **CALIBRApH**

Se trata de una utilidad, desarrollada con *CVI*, con la finalidad de realizar la calibración del electrodo de pH, aunque también puede resultar útil como diagnóstico del sistema de control de pH o como registrador de datos.



Control de las bombas e indicadores de medida.

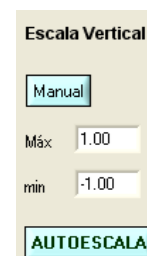


Haciendo clic en alguno de los botones se activa el dispositivo de dosificación correspondiente, a la vez que se anula la posibilidad de activar la otra bomba. (Recordar que solo se puede dosificar ácido o base, nunca ambos a la vez).

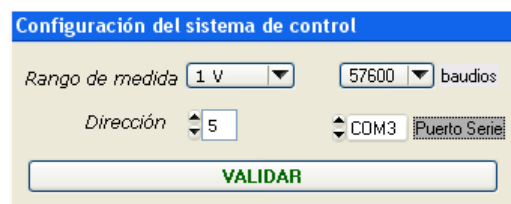
El indicador de pH mide el valor medido, una vez promediado. El parámetro *Indice* determina el número de muestras empleado para realizar el promedio de señal. En la casilla Temporizador se introduce el intervalo, en segundos, entre medidas.

Pantalla de visualización y Escala.

En el display se muestra la evolución de las medidas realizadas. La traza roja se corresponde con el valor instantáneo. La traza azul intenso es el resultado de aplicar el filtro de mediana. El eje horizontal muestra el número de medidas tomadas. El eje vertical izquierdo indica la tensión de entrada. Usa la unidad para la cual está configurado el módulo de control, que puede ser voltios o milivoltios. Este eje se reajusta cada vez que se modifica el rango de medida de entrada en la ventana de configuración, aunque también se puede ajustar manualmente, entre los valores máximos y mínimos establecidos, accionando el botón de **Manual**. El botón de **AUTOESCALA** reajusta automáticamente el eje vertical conforme a los últimos valores de tensión medidos.



Panel de configuración.



Pulsando el botón CONFIGURAR se muestra en pantalla el panel de configuración.

Se puede modificar el rango de medida, la velocidad de transmisión, la dirección asignada al módulo dentro del bus de comunicaciones y el puerto serie asociado al convertidor 485.

Al pulsar el botón de **VALIDAR** se guardan los valores en una tabla de datos de configuración y se chequea el puerto serie. Si hubiese algún error se genera un mensaje de advertencia y se deshabilita el puerto de comunicaciones.

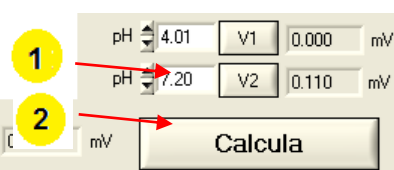
Calibrar el electrodo.

En pantalla se muestra en todo momento la ecuación $\text{pH } 5.25 = 5.5348 - 7.3260 \text{ mV}$ que relaciona el valor de pH con la medida de tensión obtenida.

Para realizar la calibración se recomienda el siguiente método:

Insertar el electrodo en un medio tamponante de pH conocido, siguiendo las instrucciones del fabricante. El electrodo debe estar fijo, mientras que la solución tamponante es conveniente que sea agitada. Introducir el valor de pH en la casilla (1) y observar la evolución de la gráfica en pantalla. Cuando la curva se estabilice y se visualice una línea recta, pulsar V1. En las instrucciones del fabricante de electrodos se suele incluir el tiempo orientativo que se debe emplear en esta etapa.

Repetir el proceso con otra solución tamponante, cuyo valor de pH se introduce en la casilla (2). Pulsar V2 cuando se estabilice la medida. Pulsando ahora en el botón **Calcula** se reajustan los coeficientes.

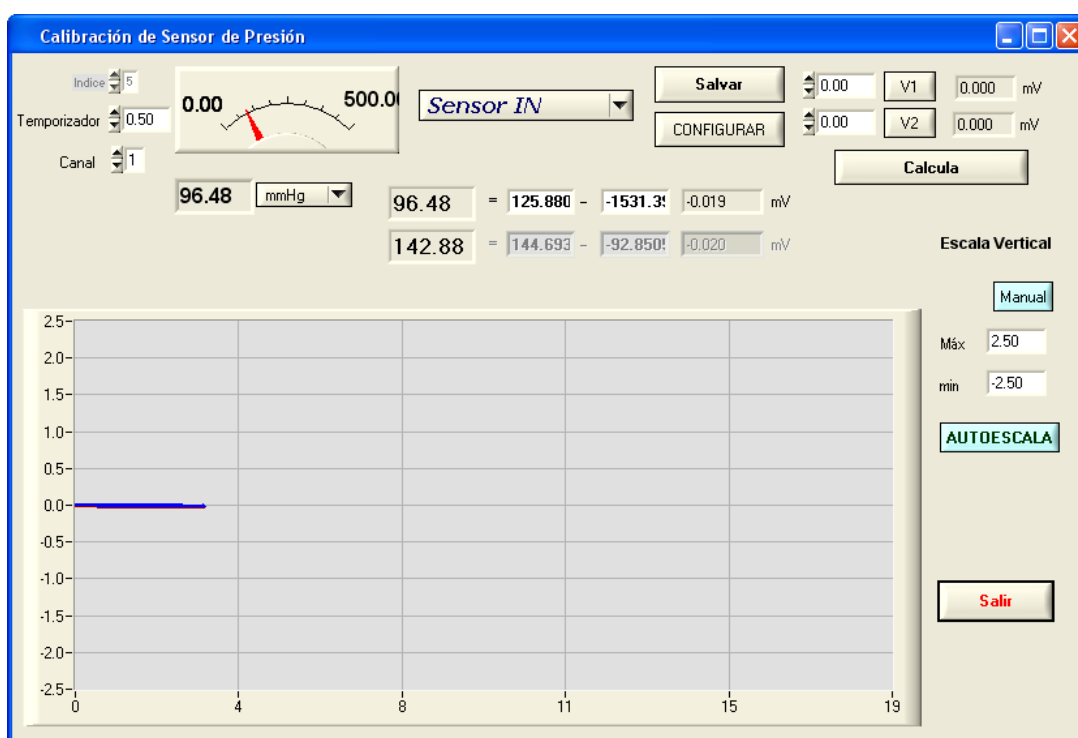


Guardar datos.

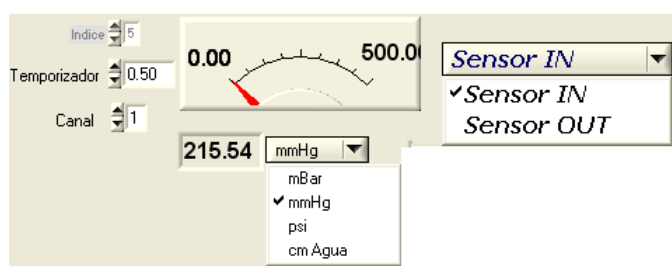
Al pulsar el botón Salvar se muestra en pantalla un panel de exploración de ficheros para seleccionar un fichero *Excel* y existente o bien crear uno nuevo. Si la operación se realiza adecuadamente se copiarán los datos de la tabla de configuración al fichero.

Programa **CALIBRAPRESION**

Se trata de una utilidad, desarrollada con *CVI*, con la finalidad de realizar la calibración del sensor de presión, aunque también puede resultar útil como diagnóstico del sistema de control de pH o como registrador de datos.



Indicadores de medida.



La aplicación está ideada para poder configurar dos sensores en un futuro, aunque por ahora solo se dispone de uno. Todos los comentarios que se realizan en este documento se refieren a la configuración *Sensor IN*, aunque también son perfectamente válidos

para la configuración de *Sensor OUT*.

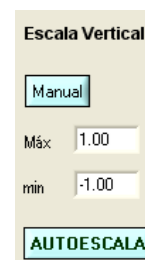
El indicador mostrado mide el valor medido, una vez promediado. El parámetro *Indice* determina el número de muestras empleado para realizar el promedio de señal.

En la casilla *Temporizador* se introduce el intervalo, en segundos, entre medidas. En la casilla *Canal* se introduce el canal analógico que se usa del módulo de adquisición de datos. Junto al valor numérico que refleja la presión medida hay un selector que permite elegir la unidad de medida.

Pantalla de visualización y Escala.

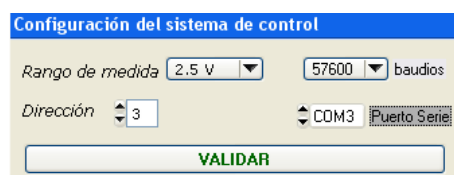
En el display se muestra la evolución de las medidas realizadas. La traza roja se corresponde con el valor instantáneo leído en el canal asociado a *Sensor IN*. La traza azul intenso es el resultado de aplicar el filtro de mediana a dicha señal. La traza verde se corresponde con el valor instantáneo leído en el canal asociado a *Sensor OUT* y la traza negra se corresponde con el resultado de aplicar el filtro de mediana a dicha señal. Si las señales de ambos canales coincidiesen, solo se visualizarían las trazas correspondientes al *Sensor IN*.

El eje horizontal muestra el número de medidas tomadas. El eje vertical izquierdo indica la tensión de entrada. Usa la unidad para la cual está configurado el módulo de control, que puede ser voltios o milivoltios. Este eje se reajusta cada vez que se modifica el rango de medida de entrada en la ventana de configuración, aunque también se puede ajustar manualmente, entre los valores máximos y mínimos establecidos, accionando el botón de **Manual**. El botón de **AUTOESCALA** reajusta automáticamente el eje vertical conforme a los últimos valores de tensión medidos.



Panel de control para la Escala Vertical. Incluye un botón 'Manual', campos de entrada para 'Máx' (1.00) y 'min' (-1.00), y un botón 'AUTOESCALA'.

Panel de configuración.



Panel de configuración del sistema de control. Campos: 'Rango de medida' (2.5 V), '57600 baudios', 'Dirección' (3), 'COM3', 'Puerto Serie'. Botón 'VALIDAR'.

Pulsando el botón CONFIGURAR se muestra en pantalla el panel de configuración.

Se puede modificar el rango de medida, la velocidad de transmisión, la dirección asignada al módulo dentro del bus de comunicaciones y el puerto serie asociado al

convertidor 485. Al pulsar el botón de **VALIDAR** se guardan los valores en una tabla de datos de configuración y se chequea el puerto serie. Si hubiese algún error se genera un mensaje de advertencia y se deshabilita el puerto de comunicaciones.

Calibrar el sensor.

En pantalla se muestra en todo momento la ecuación que relaciona el valor de la presión con la medida de tensión obtenida.

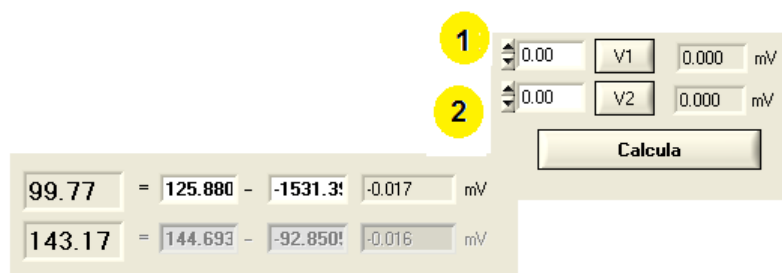
Para realizar la calibración

se recomienda el disponer de algún dispositivo de medida de presión fiable, insertado en el mismo circuito hidráulico donde se inserta el sensor de presión que se desea calibrar.

Forzar un valor de presión en el circuito hidráulico (accionando un dispositivo dosificador, por ejemplo). Introducir el valor de presión, en mmHg en la casilla (1) y pulsar V1.

Repetir el proceso con otro valor de presión distinta, que se introduce en (2). Pulsar V2.

Pulsando ahora en el botón **Calcula** se reajustan los coeficientes.



Panel de calibración. Se muestran dos entradas de presión numeradas 1 y 2. Cada entrada tiene un campo de texto, un botón (V1, V2) y un campo de tensión en mV. Debajo, se muestran las ecuaciones de calibración resultantes para cada punto.

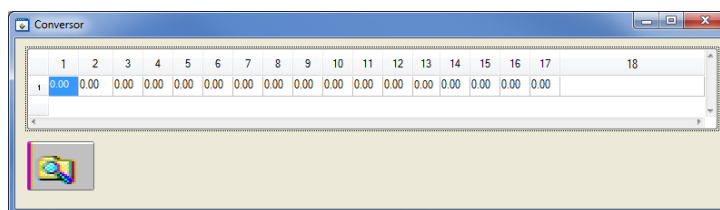
Punto	Presión (mmHg)	Tensión (mV)	Ecuación
1	99.77	0.000	$125.880 - 1531.3 \cdot 0.017$
2	143.17	0.016	$144.693 - 92.850 \cdot 0.016$

Guardar datos.

Al pulsar el botón Salvar se muestra en pantalla un panel de exploración de ficheros para seleccionar un fichero *Excel* y existente o bien crear uno nuevo. Si la operación se realiza adecuadamente se copiarán los datos de la tabla de configuración al fichero.

Programa **CONVERSOR**

El propósito de este programa es convertir los ficheros de texto generados por las aplicaciones “Reactores” o “SimulaProcesos” en ficheros con formato *Excel*.

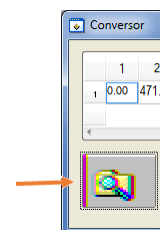


Genera ficheros con formato texto en los que quedan registrados parámetros y variables relacionados con los procesos simulados. Este programa convierte dichos ficheros en ficheros tipo *Excel*, más fáciles de manejar, y con el formato adecuado para ser manipulados posteriormente por la aplicación de gráficas que se propone para representar los resultados obtenidos.

La ejecución de este programa requiere la presencia en el directorio de instalación del fichero “plantilla.xls” y genera un fichero también con extensión “*.xls”, compatible con versiones *Excel* anteriores a 2003.

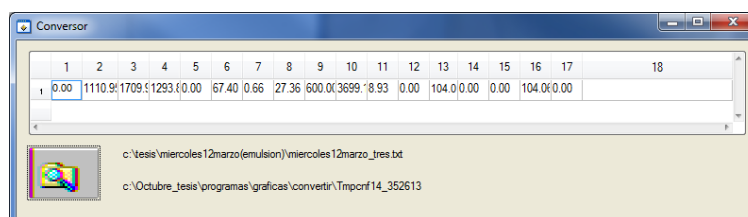
El modo de operación es simple. Basta con seleccionar el icono del explorador de archivos que se muestra en el panel de la interfaz de usuario.

La ejecución del control asociado a dicho icono despliega en pantalla una ventana de exploración para poder seleccionar el fichero de texto. Pulsar la opción “Load” para seleccionar el fichero o bien la opción “*C*ancelar” para cerrar la ventana sin realizar ninguna hacción. Por defecto esta aplicación solo permite seleccionar ficheros con extensión “*.txt”.



En caso de haber seleccionado un fichero, aparecerá una nueva ventana en la que se introduce el nombre y destino del nuevo fichero *Excel* que se va a crear. Por defecto se creará un fichero con el mismo nombre del original seleccionado, al que se va a modificar la extensión (“*.xls”) y que se va a guardar en el mismo directorio del fichero origen. La ventana de selección permite crear nuevos subdirectorios y moverse por todas las unidades, físicas y remotas, a las que tenga acceso el equipo. Una vez realizada la selección, pulsar la opción “*G*uardar”. En caso de cancelar, se generará automáticamente un fichero *Excel* en el directorio de instalación del programa, cuyo nombre estará conformado por la fecha y hora del sistema.

La ejecución del programa requiere de un tiempo variable, dependiendo de las características del equipo y del tamaño del fichero y que pueden llegar a ser minutos. Es por ello que durante el proceso de conversión se podrá visualizar en el panel de ejecución la evolución de los datos registrados. Esta información tiene por utilidad informar al usuario que el programa está ejecutandose.



Mientras se realiza la conversión, en el panel de ejecución aparecerá reflejado el nombre del fichero origen seleccionado (haciendo referencia a la ruta completa de ubicación) y en una línea inferior el nombre (más la ruta) del fichero destino.

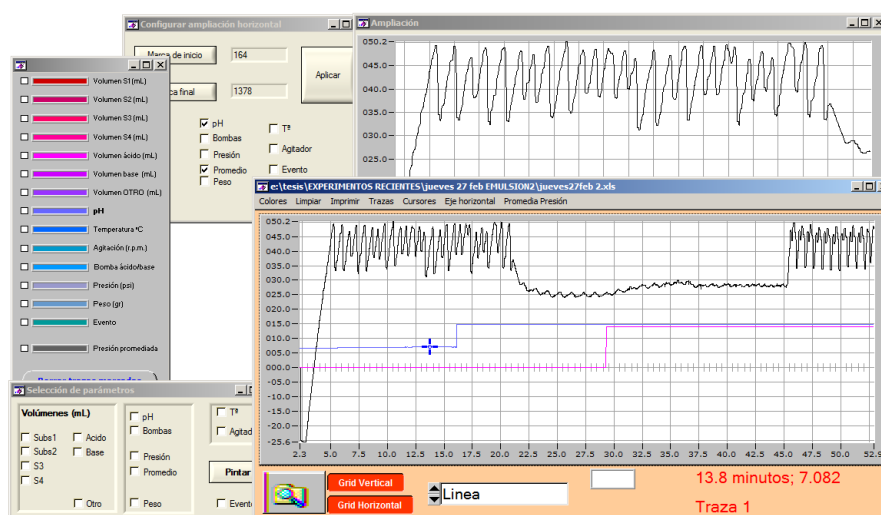
ERRORES DETECTADOS:

Se ha identificado dos posibles causas de anomalías:

- El fichero origen no responde al formato esperado. En tal caso, se producirá una finalización anormal del programa, no se creará el fichero destino o bien este no tendrá el formato adecuado.
- Falso mensaje de “no responde”, durante la conversión de ficheros de gran tamaño. En condiciones normales el mensaje desaparece al cabo de un tiempo no superior a un par de minutos. En caso de que se fuerce el cierre del programa desde el sistema operativo antes de tiempo no se generará de forma adecuada el fichero de destino.

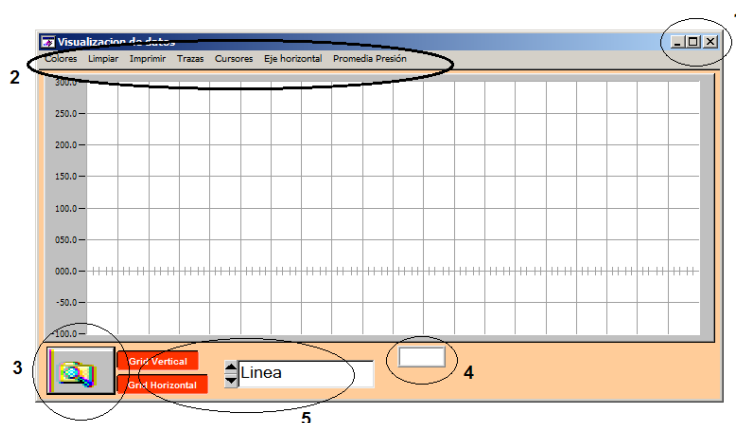
Programa **GRAFICAS**

El propósito de este programa es representar en pantalla los datos registrados por las aplicaciones “Reactores” o “Digestor” que previamente se han convertido en fichero *Excel* usando la aplicación “Conversor”.



Elementos del panel principal.

Al ejecutar el programa, se muestra el panel principal, que contiene la pantalla o display sobre la que se representarán las curvas y una serie de elementos adicionales marcados en la figura con identificadores numéricos para facilitar su descripción.



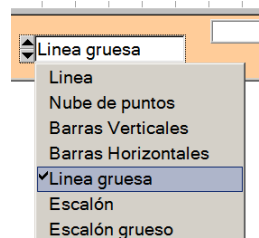
1 En la esquina superior derecha, los controles típicos de todas las aplicaciones “Windows” que permiten minimizar o maximizar la ventana y cerrar el programa.

2 Hay un menú, en la parte superior, cuyas opciones se verán más adelante.

3 En la esquina inferior izquierda se encuentra el icono del explorador de archivos. Pulsando este icono con el ratón se abre la ventana de diálogo que permite seleccionar un fichero de datos.

4 Casilla para selección de colores. Este control se activa con determinadas opciones del menú y se usa para seleccionar el color de diversas partes del panel, como se verá posteriormente.

5 Controles auxiliares. Pulsando repetidamente sobre el botón *Grid Vertical* se mostrará u ocultarán las líneas verticales de la rejilla de gráficos. Lo mismo ocurre con las líneas horizontales si se actúa sobre el botón *Grid Horizontal*. El selector de la derecha permite seleccionar distintos tipos de líneas.



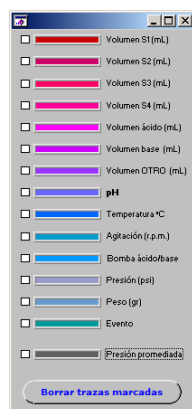
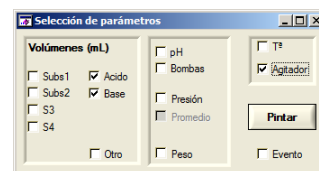
Como opción por defecto no se muestra la escala de tiempos, que se corresponde con el eje horizontal. En cualquier momento es posible hacerlo actuando sobre la correspondiente opción de menú, como se verá más adelante.

Cargar un fichero de datos y visualizar curvas.

Pulsando en el icono del selector de ficheros (elemento 3 de la figura anterior) aparece la ventana de diálogo para la selección de un fichero de datos. Se puede cancelar la operación, o bien seleccionar un fichero y pulsar *Load*, y se mostrará en pantalla una tabla en la que se observa la evolución del proceso de captura de datos y el mensaje “Cargando datos” en la parte inferior de la ventana.

Este proceso de carga de los datos del archivo puede llegar a durar unos pocos minutos, en el caso de ficheros muy grandes y ordenadores de prestaciones limitadas. Una vez finalizado, desaparece de pantalla la tabla de datos y se muestra, además del panel principal, el panel de configuración de trazas y el panel de selección de parámetros.

En el panel de selección se pueden marcar los parámetros que se desea representar activando la casilla situada a la izquierda de cada parámetro. Para el ejemplo concreto de la figura se aprecia que el usuario desea visualizar la dosificación de los reactivos ácido y base, así como la evolución del agitador. Una vez seleccionados los parámetros, pulsar el comando **Pintar**.



El panel de configuración de trazas permite modificar el color asignado a la curva que representa la evolución de cada uno de los parámetros registrados en el fichero seleccionado. Haciendo *click* con el botón izquierdo del ratón sobre cada uno de las barras que acompañan al nombre de cada parámetro, se despliega un selector que permite modificar el color asignado a dicho parámetro.

Para borrar una o varias trazas, se marca la casilla ubicada a la izquierda de cada parámetro en cuestión en el panel de selección y se pulsa el comando **Borrar trazas marcadas**. Se puede volver a pintar una curva ya existente, modificando el color o el tipo de línea. En tal caso, la curva anterior se borra automáticamente.

En cualquier momento se pueden mostrar u ocultar tanto las líneas verticales como las líneas horizontales de la gráfica, haciendo uso de los comandos **Grid Vertical** y **Grid Horizontal** respectivamente.

Opciones del menú.

SUBMENÚ Colores

Desde este submenú se configura el color del *fondo* del display del panel principal, las líneas de entrelazado (*grid*) y las trazas.

SUBMENÚ Limpiar

Este submenú incluye opciones para borrar la pantalla completamente, o solo de forma parcial.

SUBMENÚ Imprimir

Este submenú se ha incluido para facilitar la tarea de emplear las imágenes de las curvas obtenidas en otros documentos. Así, al pulsar sobre la opción de “Predisponer pantalla” se muestra una serie de instrucciones a seguir. Una vez aceptado el diálogo, la ventana adquiere una nueva apariencia en la que han desaparecido los controles, la barra de menú y otros elementos; pulsando simultáneamente las teclas “Alt”, “Imp Pant” del ordenador, la imagen mostrada en pantalla se almacena en el portapapeles, lista para ser usada por otras aplicaciones, como por ejemplo un editor de texto.

Para que la ventana del programa retorne a su aspecto habitual hay que pulsar simultáneamente las teclas “Alt”, “F4”.

SUBMENÚ Trazas.

La opción “Configurar” muestra en pantalla el panel de configuración de trazas, acción idéntica a la realizada por la opción “Marcar trazas para borrar” del submenú *Limpiar*.

La opción “Selección de parámetros” muestra por pantalla el panel de selección de parámetros.

SUBMENÚ Cursores.

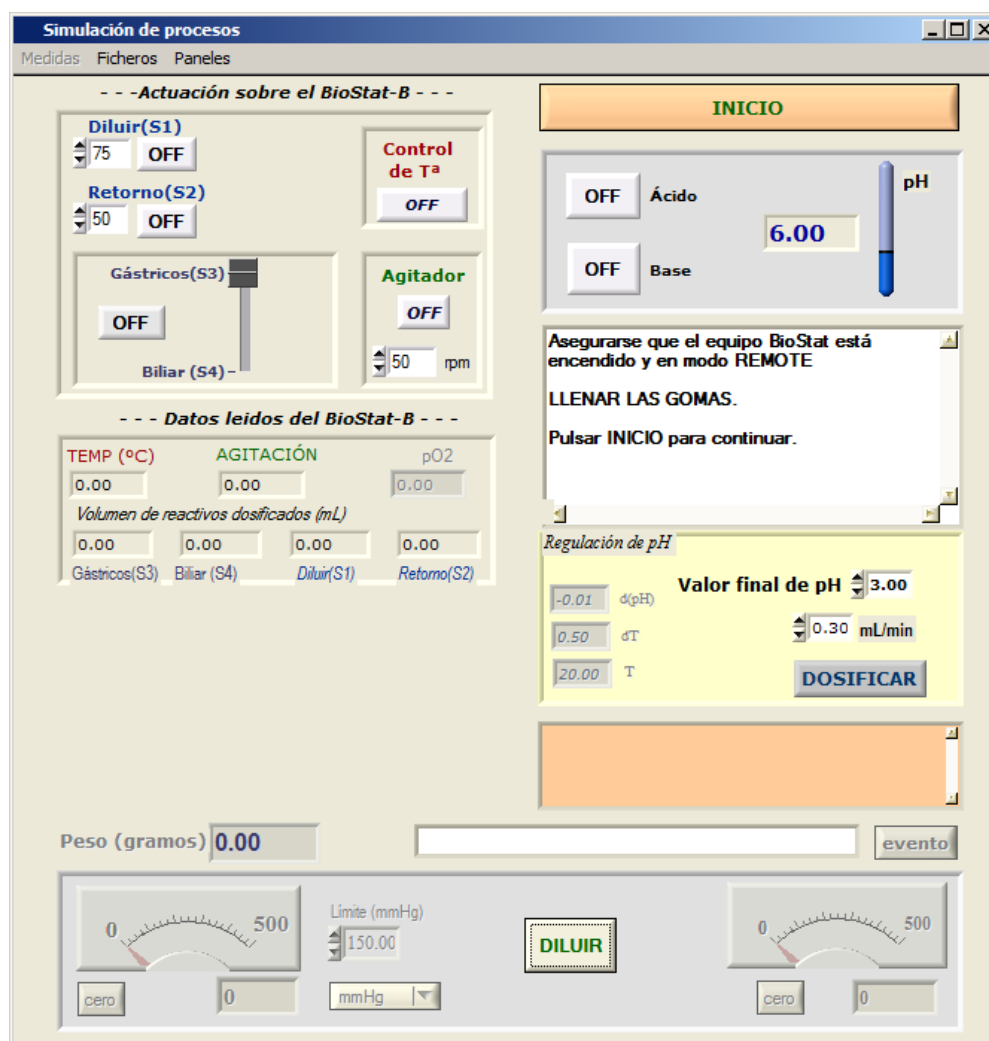
Se ofrece la opción de mostrar u ocultar un cursor, o elemento apuntador en el *display*, que permite identificar mejor las coordenadas de cada punto de las gráficas mostradas.

SUBMENÚ Eje horizontal.

Muestra u oculta la escala de tiempos del eje horizontal. El tiempo se mide en minutos.

Programa **BIODIGESTOR**

Este programa, además de permitir el control y monitorización de los diversos subsistemas, permite ejecutar determinados procesos de simulación de interés para determinados trabajos de investigación.



El programa se inicia haciendo doble “clic” en el icono asignado en el escritorio. Este icono se corresponde con el enlace de acceso directo al programa ejecutable “simulaProcesos.exe”, que por defecto se ubica en el directorio “Programas”. Para que funcione correctamente el programa, es necesario que se encuentre el fichero de interfaz de usuario “simulaProcesos.uir” en la misma carpeta que el programa ejecutable. Al ejecutar el programa se muestra en primer lugar una ventana de selección de fichero para elegir el fichero de configuración. Se recomienda usar el fichero “BioStat.xls”. Se recuerda que este fichero es generado por el programa *Reactores*. No se recomienda usar el citado fichero “conf.xls”, salvo que ocurran problemas la ejecución con otros ficheros de configuración.

En el caso de que esta carga sea infructuosa, se establecen una serie de valores por defecto, generando una advertencia de error.

La ejecución de las rutinas de inicio y configuración puede tardar varios segundos, o incluso un par de minutos, dependiendo de las características del equipo usado. La primera vez que se muestra el panel en pantalla, el recuadro superior izquierdo aparece en rojo. Una vez finalizada la carga de parámetros, y la inicialización de variables internas del programa, este recuadro cambiará a su estado normal (color crema) indicando así que ya se puede usar el programa.

En un recuadro de texto, con fondo blanco, se muestran instrucciones generales que debe seguir el usuario en todo momento. Es importante pulsar el botón de **INICIO** para completar la configuración de los subsistemas controlados por la aplicación.

El panel principal de la aplicación comprende, además de la barra superior de menú, una serie de botones e indicadores separados por zonas, que serán descritos posteriormente.

Finalización del programa.

Para cerrar la aplicación se cierra la ventana, del mismo modo que se cierra cualquier otro programa *Windows*.



De forma similar a como ocurre al iniciar el programa, se realiza un pequeño chequeo de puertos de comunicación, cerrando aquellos que estén ocupados para así liberar su uso para otras aplicaciones, y se desconectan los controles que estuviesen funcionando en el sistema *Biostat*. Estas comprobaciones, dependiendo una vez más del equipo donde se ejecute, pueden durar varios segundos, o incluso minutos.

Controles relacionados con el sistema *Biostat*.

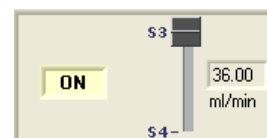
Dosificar reactivos.

Actuando sobre estos dos botones se activan o desactivan las respectivas bombas peristálticas S1 y S2, que en la aplicación propuesta manejan los circuitos hidráulicos de impulsión y retorno, respectivamente.



Cuando se pone en funcionamiento una bomba peristáltica, se visualiza también el caudal de la bomba, expresado en mililitros por minuto. El caudal se varía actuando sobre la ventana numérica que permite variar el ciclo de trabajo de dosificación, expresado en forma de porcentaje. El caudal se calcula a partir del porcentaje indicado y de un coeficiente asociado a la bomba, obtenido del fichero de configuración. Cada vez que se activen estas bombas en otras partes del programa, el sistema *Biostat* aplicará el porcentaje marcado en estas casillas.

Las bombas peristálticas destinadas a la dosificación de ácido o base en el sistema *Biosat* se destinan para dosificar otros reactivos, S3 y S4, con la salvedad de que nunca podrán dosificarse simultáneamente ambos reactivos. Al accionar este control, al igual que ocurre con los anteriores, se muestra el caudal asociado con la bomba peristáltica que mueve el reactivo seleccionado.



Control de agitador y de temperatura.

Estos controles permiten actuar en cualquier momento sobre los sistemas de regulación de agitación y temperatura, integrados en el sistema *Biostat*.

El valor de consigna de temperatura está prefijado en el fichero de configuración. Para variar dicho parámetro, hay que modificar el fichero de configuración usando el programa *Reactores*, o bien editando el fichero de configuración con *Excel* (opción no recomendada).



Está previsto variar la velocidad del agitador entre 50 y 1200 revoluciones por minuto. Cualquier valor inferior es adoptado como *cero* por la aplicación.



Para detener la regulación de temperatura, hacer “click” en el indicador numérico.

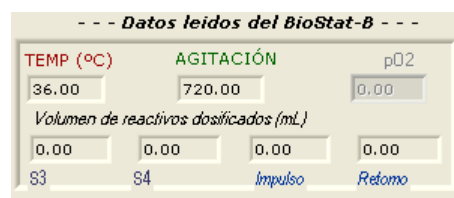


Indicadores del sistema *Biostat*.

Se muestra una serie de indicadores numéricos que deben coincidir con los parámetros visualizados en la pantalla indicadora del equipo *Biostat* cuando se configura la opción “*Process Value*”. Algunos de estos valores son usados por la aplicación y otros no.

Estos datos se actualizan cada cinco segundos, como opción por defecto. Este intervalo de actualización se puede modificar mediante las opciones del submenú “Medidas-→BioStat→Velocidad de lectura”.

En esta ventana aparecen los reactivos identificados con los nombres asignados en el fichero de configuración. Para modificar estas etiquetas, es preciso modificar el fichero de configuración, bien empleando el *Excel* (opción no recomendada) o bien haciendo uso del programa *Reactores*.



Control de pH.

El control del pH se realiza con módulos ICP-CON. Con los botones de este cuadro se puede accionar manualmente las bombas peristálticas que dosifican ácido y base. Se deshabilitan durante determinados procesos de regulación automática y no está permitida la dosificación simultánea de ambos reactivos (la acción sobre un comando deshabilita al otro). Además de los controles de actuación sobre las bombas, el panel incluye un indicador de medida de pH, con doble indicación: numérica y gráfica. La medida de pH se realiza de modo continuo, en todo momento. El programa realiza una serie de promedios a partir de los valores medidos, usando como parámetro el índice de promediado, que se puede variar en la opción de menú que se verá más adelante. Desde el menú también es posible modificar el tiempo de muestreo; la opción por defecto es de una lectura cada 0,75 s.



Medida de presión.

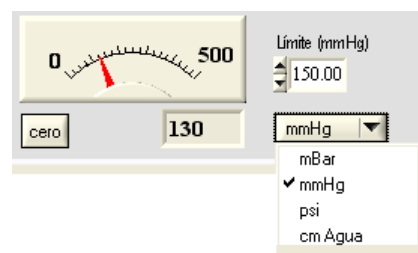
El sistema está preparado para representar dos medidas de presión. Para habilitar la medida de presión, configurar las opciones de promediado o determinar el número de sensores, hay que usar el submenú “Medidas → Presiones”.

Por defecto, la unidad de presión usada es el mmHg,

aunque se puede seleccionar cualquiera otra de las que aparecen en el selector ubicado a la derecha del indicador numérico.

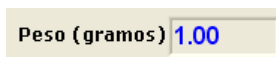
El sistema está concebido para medir variaciones de presión. En este sentido, el botón cero sirve para tomar la medida actual como valor de referencia.

El control Límite (mmHg) establece un valor de consigna en los procesos automáticos de regulación de presión.



Peso.

En esta casilla se indica el valor numérico extraído del comando recibido de la balanza, cuando se habilita dicho interfaz desde la correspondiente opción de menú.

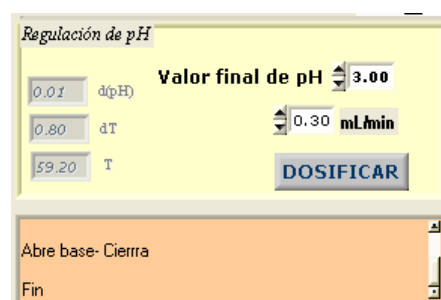


Regulación de pH.

Con esta ventana se define un valor final de pH y el nivel de segregación de ácido.

Cuando se da la orden de **DOSIFICAR**, el programa compara el valor final de pH indicado (también denominado “punto de consigna”) con el valor actual de pH medido. Si dicha diferencia de dos décimas, no se realiza acción alguna. Si el pH medido supera el valor final de pH indicado se inicia el proceso de regular la dosificación de ácido. Si el pH medido es inferior al valor de consigna se inicia el proceso de regular la dosificación de base. En la ventana de texto se muestra información acerca de cómo evoluciona el proceso de regulación, el cual concluye cuando la diferencia (en valor absoluto) entre el valor medido y el punto de consigna se aproxima a una décima.

En la parte izquierda del recuadro se muestra una columna de parámetros auxiliares que reflejan la última variación de pH y los intervalos de apertura y cierre previstos para el dispositivo de dosificación.

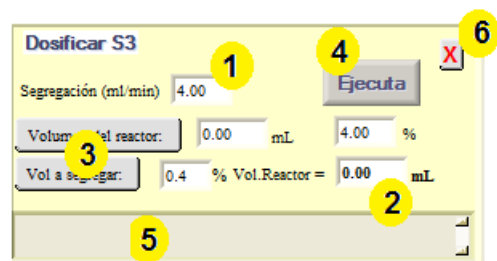


Dosificar reactivo.

Esta ventana se muestra u oculta desde la opción de menú “Paneles→Dosifica S3”. La dosificación de reactivo usando la bomba S4 se realiza de forma idéntica.

Los dos parámetros necesarios para realizar la dosificación se pueden introducir directamente en las casillas (1) (segregación, o caudal, expresado en mL/min) y (2) (volumen a segregar, en mL).

Éste último dato se puede calcular como un porcentaje del volumen de reactor. El volumen



del reactor a su vez se puede calcular automáticamente pulsando en el botón correspondiente, o bien introducirlo manualmente.

Al pulsar sobre el botón **Ejecuta** (4) se inicia el proceso de dosificación. En la ventana de texto se informa del número de dosificaciones parciales que se van a realizar y el tiempo de duración aproximado. También se muestra un signo de asterisco cada vez que se realiza una dosificación parcial. El proceso concluye cuando se ha dosificado la cantidad solicitada. La ventana se

oculta automáticamente. También se puede detener el proceso pulsando el botón **Detiene** o cerrando la ventana al pulsar en el botón **X** (6).

Gestión de volúmenes.

Los controles de este cuadro están destinados a conocer y modificar el volumen de cada uno de los reactivos que intervienen en el proceso, y por consiguiente, el volumen total del reactor.

Por cada reactivo se muestra un indicador que expresa el volumen parcial de dicho producto, y una casilla de selección.

Solo se puede seleccionar un producto, y las funciones disponibles están habilitadas o no en función de la ejecución de otras partes del programa.

Los valores correspondientes a reactivos controlados por el equipo *Biostat* se actualizan según el ritmo marcado por la opción de menú “Medidas→BioStat→Velocidad de lectura”.

Los volúmenes de ácido y base se actualizan cada vez que se usa la correspondiente bomba peristáltica, a continuación de la orden de cierre.

Cada reactivo controlado por el equipo *Biostat* se identifica con un nombre (etiqueta) que se puede modificar con el programa *Reactor* y se almacena en el fichero de configuración.

Se ha incluido un reactivo adicional, con la etiqueta genérica de **OTRO**, que puede resultar útil para compensar volúmenes, o englobar reactivos añadidos a la vasija sin el control del sistema.

Vaciar.

Esta acción pone todos los volúmenes a *cero*. No es operativa mientras se está realizando una dosificación.

Añadir.

Añade el reactivo seleccionado. No se permite actuar sobre determinados reactivos cuando se está realizando un proceso automático de regulación. Con esta acción, aparece una ventana numérica para indicar un valor de volumen. Al pulsar **OK** se dosificará la cantidad indicada. Recuérdese que el ciclo de trabajo de la bomba (medido en tanto por ciento) se corresponde con el valor indicado en (1). No se realizará ninguna acción si se indica un volumen igual a cero, si no se selecciona ningún reactivo, o se seleccionan reactivos distintos a los permitidos.

Corregir.

Se puede emplear esta opción para corregir de forma manual el volumen del reactivo indicado. Esta opción tiene utilidad si se ha actuado de forma manual sobre las bombas peristálticas, o para realizar pequeñas correcciones puntuales. No es operativa mientras se está realizando una regulación automática.

Panel Tabla.

Lecturas de datos

Fichero de datos: c:\master13\TFM\PROGRAMAS\SIMULAPROCESOS\N.txt

t	S1	S2	S3	S4	acid	base		pH	T°	r.p.m	peso	presion	comentarios			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	70.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	70.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	71.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	72.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	73.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	74.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	74.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Este panel se muestra cuando hay un fichero de datos activo y se ejecuta la correspondiente orden desde el submenú “Paneles→Panel Tabla”. Se oculta cerrando la ventana o usando el submenú anterior.

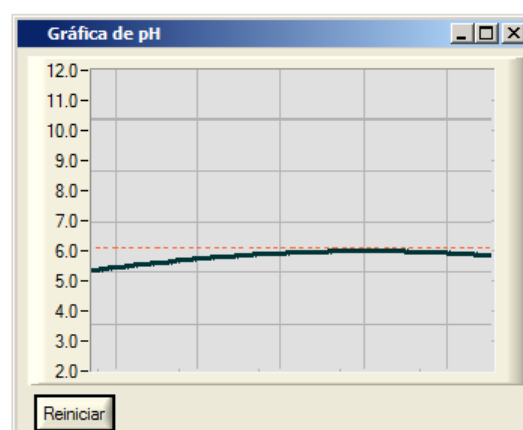
Se recoge información de un conjunto de parámetros que se graba en un fichero de texto, con extensión *.txt. Cada fila de la tabla es una línea de dicho fichero y los datos están separados por puntos y comas para facilitar su tabulación con otros programas.

Periódicamente se genera una fila de datos, y cuando se contabilizan 20 filas, se vuelca el contenido al fichero y se borra la tabla.

Panel Gráfica.

Este panel se muestra solo cuando se ejecuta la correspondiente orden desde el submenú “Paneles→Panel Gráfica”. Se oculta cerrando la ventana o usando el submenú anterior.

Muestra una evolución con el tiempo de las medidas de pH realizadas. En este panel, se generan puntos conforme se realizan medidas de pH. El intervalo de tiempo transcurrido entre una medida y otra puede variar. Así pues, el eje horizontal no se debe considerar como base de tiempos, pues no responde a una escala fija. Este panel tan solo pretende ser orientativo sobre la evolución del proceso de regulación.



Durante el proceso de *Regulación de pH* se muestran dos curvas en la gráfica. Con trazo más grueso se representa el valor de pH leído. Con trazo fino discontinuo se muestra el valor final de pH (o valor de consigna).

Para una representación exacta de la evolución del pH con el tiempo se recomienda emplear los datos que aparecen en el *Panel Tabla*, y que son exportables a fichero de texto.

Opciones del menú.

SUBMENÚ *Medidas*

- *Velocidad de lectura* Está relacionada con módulos *ICP-CON* y afecta a las medidas de presión y pH. El valor por defecto es de una medida cada 0,75 segundos.
- *Medida de pH → Promediado* Se configura el número de muestras sobre el que se aplica el filtro de mediana.
- *BioStat → Velocidad de lectura* Intervalo de tiempo transcurrido entre mensajes de petición de datos enviados al equipo *Biostat*. El valor por defecto es de una petición cada 5 segundos.
- *Presiones → Medir* Se habilita o deshabilita la medida de pH. Se indica si se emplean uno o dos sensores de presión y se configura el promediado de la señal.
- *Bascula* Se habilita o no la comunicación con el interfaz asociado a la báscula y se configura el número de lecturas por unidad de tiempo. El valor por defecto es de una lectura cada dos segundos.

SUBMENÚ *Ficheros*

- *Nuevo fichero de datos* Cierra el fichero de datos activo, si hubiese alguno definido, y muestra una ventana de explorador de archivos para seleccionar un fichero de texto ya existente o crear un fichero nuevo.
- *Configuración* Abre una ventana de explorador de archivos para seleccionar un fichero *Excel* de configuración. Si se selecciona un fichero correcto, se reajustan los parámetros del sistema conforme a los nuevos datos de configuración.
- *Directorio de trabajo* Abre una ventana de explorador de archivos para seleccionar un directorio ya existente o crear uno nuevo. Este directorio se mostrará por defecto cada vez que se acceda a alguna de las opciones anteriores.

SUBMENÚ *Paneles*

Desde este submenú se pueden mostrar u ocultar los paneles de *Tabla*, *Gráfica*, *Dosifica S3*, *Dosifica S4* y *Gestión de volumen*.

ANEXO V: INFORMES DE ANÁLISIS QUÍMICOS

Inserco 14-1289-01 Informe del análisis de emulsión alimentaria original

Inserco 14-1291-01 Informe del análisis de emulsión alimentaria digerida,

SCAI Macelignan_GIT0 Espectro de macelignano obtenido mediante HESI-MS.

SCAI Macelignan_GIT1 Espectro de muestra resultante del ensayo de digestión de *NPLs* que contienen macelignano.

SCAI OR1290_P3 Cromatograma y espectro de masas de *PS122*.

SCAI OR1290_NPS_3 Listado de masas del análisis de producto filtrado obtenido una vez simulada la digestión de *NPLs* que contienen *PS122*.



ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS
SERVICIOS TECNOLÓGICOS

INFORME DE ENSAYO 14-1289-01

IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE	
NOMBRE:	Universidad de Granada
DIRECCIÓN:	
TELÉFONO:	FAX:
PERSONA DE CONTACTO:	E. Rivas

TOMA DE MUESTRAS	
Responsable:	La muestra ha sido tomada por el cliente
Fecha de muestreo:	Hora:
Punto de Muestreo:	
Procedimiento de Toma de Muestra:	
Identificación de la Muestra:	
Contenida en:	
Observaciones:	

RECEPCIÓN	
MUESTRA DE:	Emulsión O3
S/RFA:	MBO.2-0
Fecha de Recepción:	10/03/2014
Contenida en:	Vial de plástico
Observaciones del Laboratorio:	

ANÁLISIS	
Fecha Inicio:	10/03/14
Fecha Fin:	17/03/14

PARAMETRO	Resultado ¹	P. de Ensayo	Método
Grasa bruta (%)	27,69	PEN/0079	Gravimetría

Riqueza

Perfil ácidos grasos en el aceite		PEN/0306	Cromatografía de gases
Ácido Eicosapentanoico C20:5 n3 (mg/g como EE)	699,0		
Perfil ácidos grasos en el producto		PEN/0306	Cromatografía de gases
Ácido Eicosapentanoico C20:5 n3 (mg/mL como EE)	193,5		

OBSERVACIONES

¹ Los resultados expresados como "<" indican el Límite de Cuantificación del método.
Las incertidumbres de medida se encuentran a disposición del cliente.
Los resultados obtenidos son únicamente representativos de la muestra objeto de los ensayos.
Este documento no podrá reproducirse ni total ni parcialmente, sin la autorización expresa del laboratorio.

17 de Marzo de 2014

Gloria Delgado
Jefe de Laboratorio



ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS
SERVICIOS TECNOLÓGICOS

INFORME DE ENSAYO 14-1291-01

IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE

NOMBRE: Universidad de Granada

DIRECCIÓN:

TELÉFONO:

FAX:

PERSONA DE CONTACTO: E. Rivas

TOMA DE MUESTRAS

Responsable: La muestra ha sido tomada por el cliente

Nº Acta:

Fecha de muestreo: Hora:

Punto de Muestreo:

Procedimiento de Toma de Muestra:

Identificación de la Muestra:

Contenida en:

Observaciones:

RECEPCIÓN

MUESTRA DE: Emulsión O3

Nº DE REGISTRO: 14-1291

S/RFA: MBO.2-2

Fecha de Recepción: 10/03/2014

Hora: 10:50

Contenida en: Vial de plástico

Observaciones del Laboratorio:

ANÁLISIS

Fecha Inicio: 10/03/14

Fecha Fin: 17/03/14

PARAMETRO	Resultado ¹	P. de Ensayo	Método
Grasa bruta (%)	0,60	PEN/0079	Gravimetría

Riqueza

Perfil ácidos grasos en el aceite PEN/0306 Cromatografía de gases

Ácido Eicosapentanoico C20:5 n3 (mg/g como EE) 250,4

Perfil ácidos grasos en el producto PEN/0306 Cromatografía de gases

Ácido Eicosapentanoico C20:5 n3 (mg/mL como EE) 1,500

OBSERVACIONES

¹ Los resultados expresados como "<" indican el Límite de Cuantificación del método

Las incertidumbres de medida se encuentran a disposición del cliente.

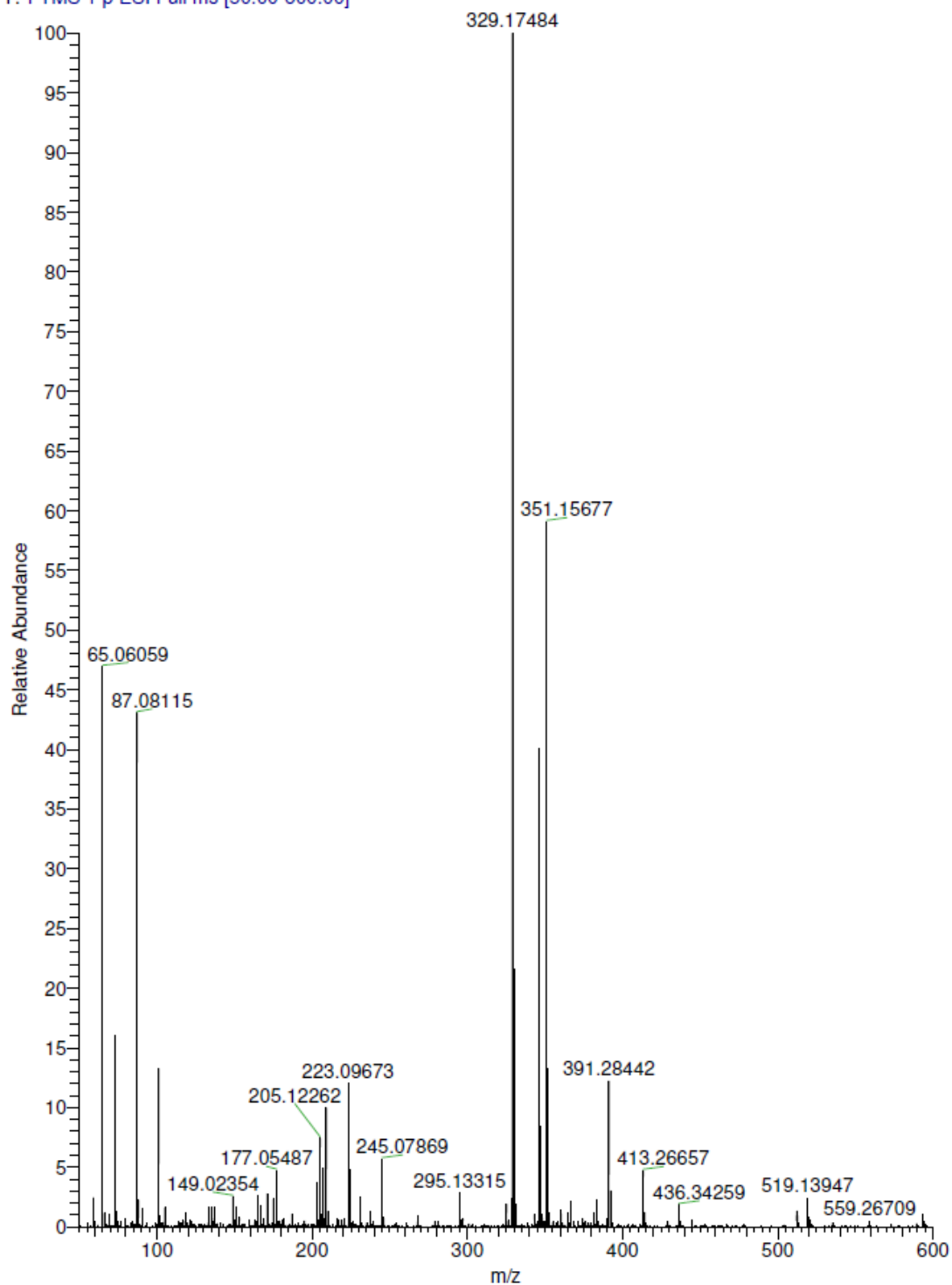
Los resultados obtenidos son únicamente representativos de la muestra objeto de los ensayos.

Este documento no podrá reproducirse ni total ni parcialmente, sin la autorización expresa del laboratorio.

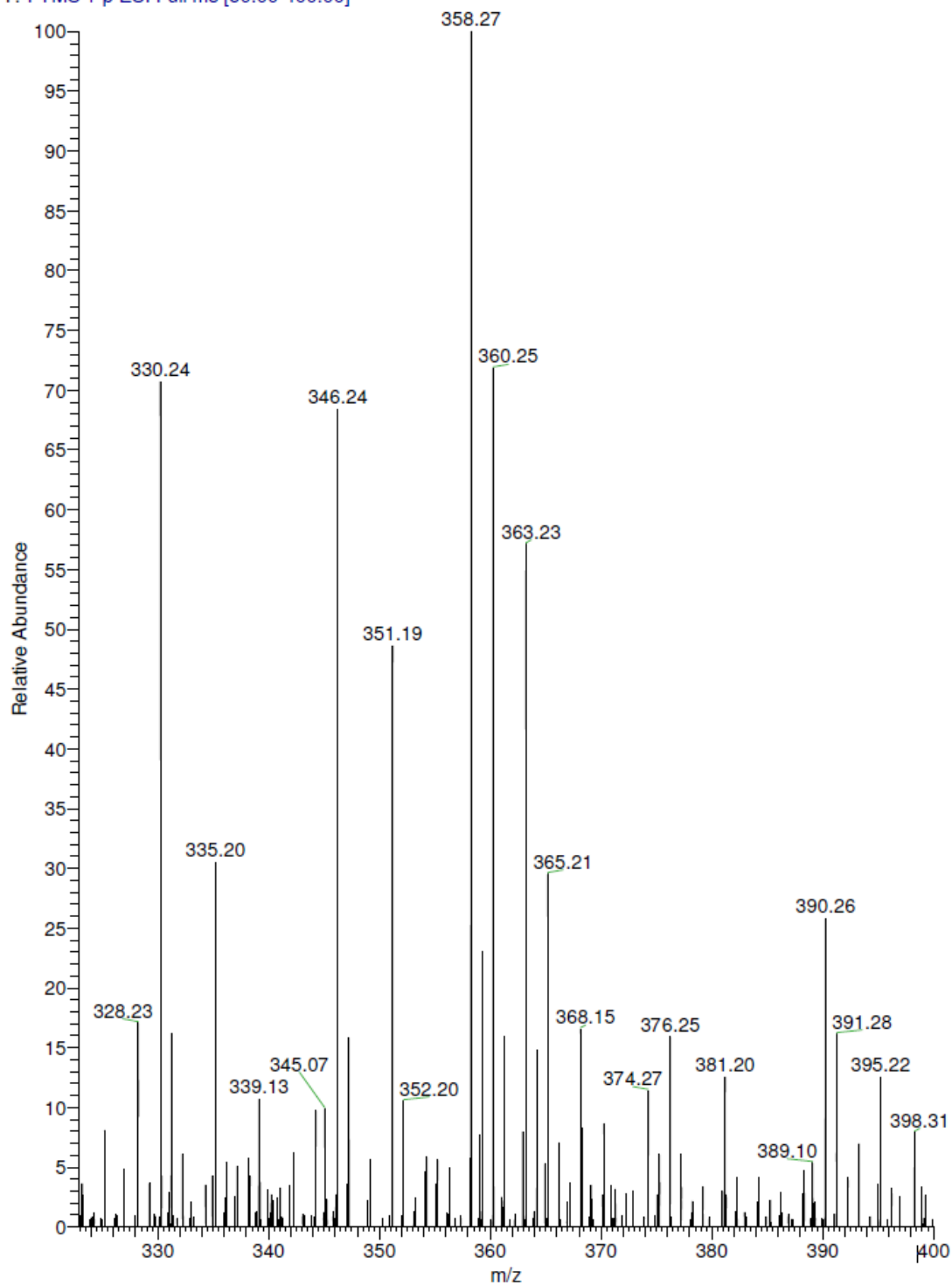
17 de Marzo de 2014

Gloria Delgado
Jefe de Laboratorio

macelignan_ GT10 indirect 5 #1 RT: 0.04 AV: 1 NL: 3.29E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-600.00]



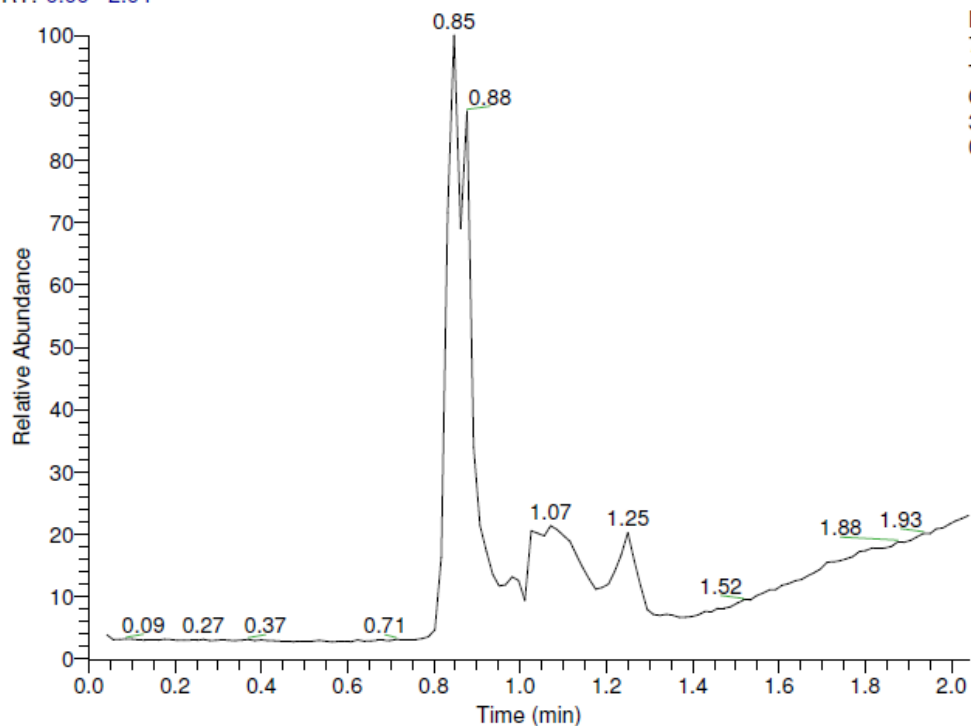
macelignan_GIT1_indirect #1 RT: 0.03 AV: 1 NL: 1.89E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-400.00]



C:\DATOS\...OR1290_P3_140401100146

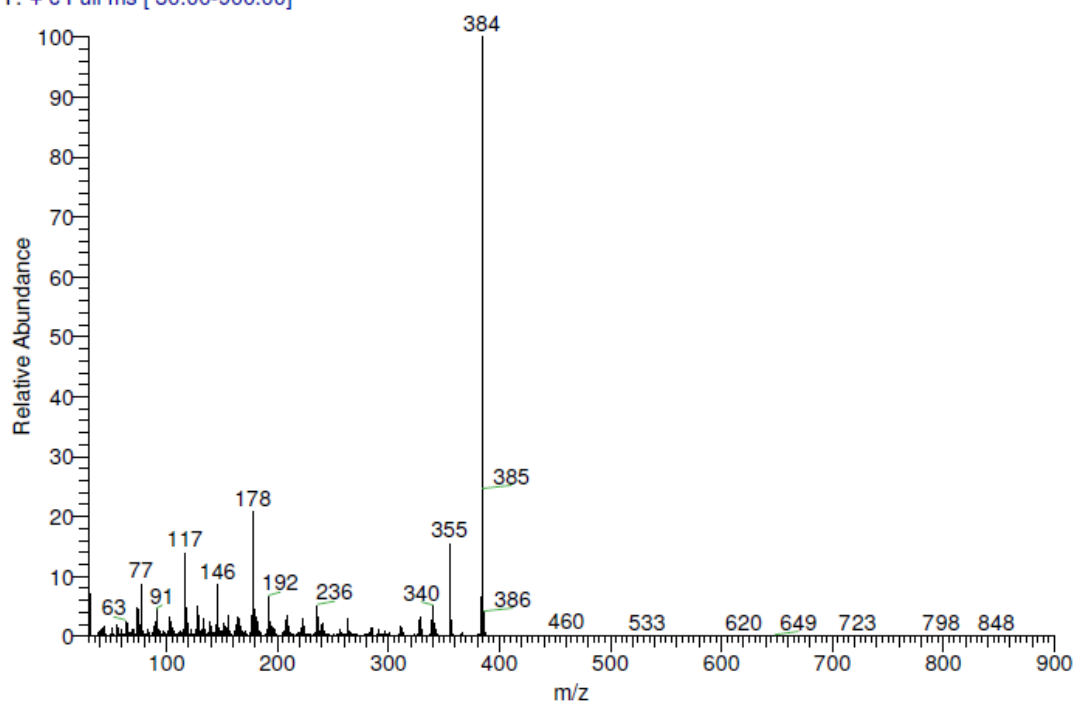
04/01/14 10:01:46

RT: 0.00 - 2.04



NL:
7.49E7
TIC F: MS
OR1290_P
3_1404011
00146

OR1290_P3_140401100146 #55 RT: 0.85 AV: 1 NL: 1.51E7
T: + c Full ms [30.00-900.00]



OR1290_NPS_3_140401112801#60 RT: 0.92

T: + c Full ms [30.00-900.00]

m/z	Intensity	Relative
377	2092.0	0.03
378	3074.0	0.05
378	3302.0	0.05
379	3173.0	0.05
380	2761.0	0.04
381	4512.0	0.07
382	28395.0	0.43
383	13774.0	0.21
384	134583.0	2.05
385	37135.0	0.57
386	15854.0	0.24
387	10333.0	0.16
388	5034.0	0.08
389	4770.0	0.07
390	6277.0	0.10
391	3747.0	0.06
392	3654.0	0.06
393	907.0	0.01
393	4859.0	0.07
394	6406.0	0.10
395	6426.0	0.10
396	8884.0	0.14
397	3579.0	0.05
398	2489.0	0.04
399	3917.0	0.06
400	2670.0	0.04
401	5875.0	0.09
402	1412.0	0.02
403	4086.0	0.06
404	4080.0	0.06
405	5060.0	0.08
406	4665.0	0.07
407	1704.0	0.03
408	2126.0	0.03
409	3750.0	0.06
410	2509.0	0.04
411	5738.0	0.09
412	5327.0	0.08
413	10021.0	0.15
414	6012.0	0.09
415	6657.0	0.10
416	2367.0	0.04
417	2808.0	0.04
418	489.0	0.01
419	6491.0	0.10
420	3461.0	0.05
421	3533.0	0.05
422	1563.0	0.02
423	2216.0	0.03
424	724.0	0.01
425	2296.0	0.03
426	1546.0	0.02
427	3166.0	0.05
428	3444.0	0.05
429	38820.0	0.59
430	16457.0	0.25
431	10824.0	0.16
432	4230.0	0.06
433	3158.0	0.05
434	2543.0	0.04

