FACULTADE DE CIENCIAS

MÁSTER en INNOVACIÓN en NUTRICIÓN, SEGURIDADE e TECNOLOXÍA ALIMENTARIAS

D.ª Paula Roade Pérez

DESENVOLVEMENTO E OPTIMIZACIÓN DUN NOVO MODELO DINÁMICO *IN VITRO* PARA A SIMULACIÓN DO SISTEMA DIXESTIVO HUMANO E A SÚA APLICACIÓN NO ÁMBITO DAS CIENCIAS DA SAÚDE

Traballo Fin de Máster

Enero 2024

Índice

Índice de figuras **3**
Resumo **4**
Resumen **5**
Abstract **6**
1. Introdución **7**
1.1. Tipos de simuladores gastrointestinais dinámicos 12
2. Obxectivo **22**
3. Materiais e métodos **23**
4. Resultados e discusión **24**
4.1. Desenvolvemento do modelo: “GastroIntestinal DIgestion System (GIDIS)” 24
4.2. Optimización do proceso de dixestión gastrointestinal 29
4.2.1. Optimización do proceso de mastigación e deglutición: a boca 31
4.2.2. Optimización do proceso de dixestión gástrica: o estómago 34
4.2.3. O proceso de dixestión e absorción intestinal: o Intestino delgado 38
4.2.4. O proceso de dixestión colónica 42
5. Conclusións **46**
6. Bibliografía **47**

Índice de figuras

Figura 1. Esquema simplificado dun sistema “batch culture” 10
Figura 2. Representación esquemática do modelo SHIME. 13
Figura 3. Simulador gastrointestinal TIM-1 14
Figura 4. Simulador gastrointestinal dinámico SIMGI 15
Figura 5. Arquitectura do ESIN 16
Figura 6. “Sistema Dinámico *In Vitro*” (DIDGI) 17
Figura 7. “Modelo Gástrico Dinámico” (DGM) 18
Figura 8. “Simulador Gástrico Humano” (HGS) 19
Figura 9. Predeseños do simulador gastrointestinal na fase de desenvolvemento 25
Figura 10. Deseño final do GastroIntestinal DIgestion System (GIDIS) sobre plano 25
Figura 11. Vista da páxina principal da aplicación BIOPRO PLANT no control computarizado do GIDIS 27
Figura 12. Vista da páxina de control dixestivo da sección estomacal no control computarizado do GIDIS 29
Figura 13. Diagrama de fluxo do método de dixestión segundo o protocolo INFOGEST 2.0 31
Figura 14. Vista da sección da boca do GIDIS 32
Figura 15. Vista de sección estomacal no GIDIS 35
Figura 16. Vista da sección do intestino delgado do GIDIS 39
Figura 17. Vista das tres seccións que compoñen o intestino groso 42
Figura 18. Esquema dos parámetros optimizados en cada rexión do GIDIS 44

DESENVOLVEMENTO E OPTIMIZACIÓN DUN NOVO MODELO DINÁMICO *IN VITRO* PARA A SIMULACIÓN DO SISTEMA DIXESTIVO HUMANO E A SÚA APLICACIÓN NO ÁMBITO DAS CIENCIAS DA SAÚDE

Resumo

Cada vez hai máis conciencia entre a poboación acerca dos beneficios ou inconvenientes que poden carrear para a saúde os distintos compoñentes que forman os alimentos. Para avaliar os efectos destes elementos, cabe pensar que o método más axeitado son os estudos *in vivo* en humanos ou animais. Porén, non é doado levalos a cabo por consideracións éticas, económicas, etc. Debido a isto, como alternativa, nos últimos anos desenvolvéronse modelos *in vitro* estáticos e dinámicos, que permiten simular as condicións do aparato dixestivo durante a dixestión, sendo os modelos dinámicos os que máis se aproximan a esta simulación, dado que poden reproducir condicións cambiantes e en continuo segundo avanza a dixestión. O funcionamento deste tipo de sistemas debe afinarse para asegurar que as condicións do tracto gastrointestinal humano se reproducen coa maior precisión posible.

Por tanto, o obxectivo deste traballo é o desenvolvemento e optimización dun novo modelo dinámico *in vitro* para a simulación de sistema dixestivo humano e a súa aplicación nas ciencias da saúde. Para levalo a cabo, e como en todo traballo experimental, é necesario realizar unha revisión bibliográfica da literatura científica máis relevante sobre, por un lado, as condicións fisiolóxicas baixo as que se leva a cabo a dixestión humana e, por outro lado, o funcionamento doutros simuladores dixestivos, tanto dinámicos como estáticos, así como a revisión dos protocolos ou normas referentes a eles, coa fin de desenvolver un sistema gastrointestinal dinámico diferente aos xa existentes e poder optimizar os seus parámetros do xeito máis semellante posible á dixestión humana.

Palabras chave: simulador, gastrointestinal, *in vitro*, dinámico, saúde.

DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO DINÁMICO *IN VITRO* PARA LA SIMULACIÓN DEL SISTEMA DIGESTIVO HUMANO Y SU APLICACIÓN EN EL ÁMBITO DE LAS CIENCIAS DA LA SALUD

Resumen

Cada vez hay más conciencia entre la población acerca de los beneficios e inconvenientes que pueden acarrear para la salud los distintos componentes que forman los alimentos. Para evaluar los efectos de estos elementos, cabe pensar que el método más adecuado son los estudios in vivo en humanos y animales. No obstante, no es sencillo llevarlos a cabo por consideraciones éticas, económicas, etc. Debido a esto, como alternativa, en los últimos años se desarrollaron modelos *in vitro* estáticos y dinámicos, que permiten simular las condiciones del aparato digestivo durante la digestión, siendo los modelos dinámicos los que más se aproximan a esta simulación, debido a que pueden reproducir las condiciones cambiantes y en continuo según avanza la digestión. El funcionamiento de este tipo de sistemas debe afinarse para asegurar que las condiciones del tracto gastrointestinal humano se reproducen con la mayor precisión posible.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es el desarrollo y optimización de un nuevo modelo dinámico *in vitro* para la simulación del sistema digestivo humano y su aplicación en el ámbito de las ciencias da la salud. Para llevarlo a cabo, y como en todo trabajo experimental, es necesario realizar una revisión bibliográfica de la literatura científica más relevante sobre, por un lado, las condiciones fisiológicas bajo las que se lleva a cabo la digestión humana y, por otro lado, el funcionamiento de otros simuladores digestivos, tanto dinámicos como estáticos, así como la revisión de protocolos y normas referentes a ellos, con el fin de desarrollar un sistema gastrointestinal dinámico diferente a los ya existentes y poder optimizar sus parámetros de la forma más similar posible a la digestión humana.

Palabras clave: simulador, gastrointestinal, *in vitro*, dinámico, salud.

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A NEW *IN VITRO* DYNAMIC MODEL FOR THE SIMULATION OF THE HUMAN DIGESTIVE SYSTEM AND ITS APPLICATION IN THE FIELD OF HEALTH SCIENCES

Abstract

There is a growing awareness among the population about the health benefits and disadvantages of the different components that make up food. In order to assess the effects of these elements, it may be thought that the most appropriate method is *in vivo* studies in humans and animals. However, it is not easy to carry them out due to ethical, economic considerations, etc. Because of this, as an alternative, in recent years static and dynamic *in vitro* models have been developed, which allow simulating the conditions of the digestive system during digestion, with dynamic models being the closest to this simulation, because they can reproduce the changing and continuous conditions of digestion process. The operation of these types of systems must be polished to ensure that the conditions of the human gastrointestinal tract are reproduced as accurately as possible.

Therefore, the aim of this work is the development and optimization of a new *in vitro* dynamic model for the simulation of the human digestive system and its application in the field of health sciences. To carry it out, and as in all experimental investigation, it is necessary to carry out a bibliographic review of the most relevant scientific literature on, on the one hand, the physiological conditions under which human digestion is carried out and, on the other hand, the functioning of other digestive simulators, both dynamic and static, as well as the review of protocols and standards referring to them, in order to develop a dynamic gastrointestinal system different from the existing ones and to be able to optimize its parameters in the most similar way possible to human digestion.

Key words: simulator, gastrointestinal, *in vitro*, dynamic, health.

1. Introdución

O sistema gastrointestinal humano xoga un papel moi importante na saúde dos individuos, xa que non só é responsable da dixestión dos alimentos, senón que participa noutras moitas funcións, como poden ser a regulación hormonal e a actividade do sistema inmune. Ademais, os últimos avances no coñecemento da composición e actividade dos microorganismos que nel habitan reforzan e poñen en relevancia a importancia que ten na saúde humana.

Así, ademais dos compoñentes alimentarios que son dixeridos e metabolizados para dar enerxía e sustento ás nosas células e funcións básicas, hai compoñentes específicos dos alimentos como poden ser os prebióticos, probióticos e antioxidantes, entre outros, que, ao seu paso polo tracto gastrointestinal (TGI), poden estimular o sistema inmunolóxico, mellorar a saúde intestinal, modular positivamente a microbiota e incluso inhibir patóxenos oportunistas (Wu *et al.,* 2020). Porén, tamén hai compoñentes que poden afectar a todas estas funcións de maneira negativa (aditivos alimentarios, antibióticos...), causando ou agravando patoloxías e/ou estados de disbiose intestinal (Roca-Saavedra *et al.,* 2018).

Para avaliar todos estes efectos e asegurar que un alimento poida ser seguro e/ou saudable, é necesario levar a cabo estudos *in vivo*, en animais e/ou en humanos. Estudos que son laboriosos, caros, con numerosos aspectos éticos a cumprir e que son, moitas veces, pouco reproducibles (Sensoy, 2021).

No caso dos estudos en humanos, estes están limitados por consideracións éticas, pois entender a resposta fisiolóxica que provoca un determinado compoñente ou alimento ó seu paso polo TGI humano só pode conseguirse con procesos invasores como a aspiración do contido do estómago ou do intestino, ou procesos non invasores pero menos sensibles como as técnicas de imaxe (Brodkorb *et al.*, 2019), ademais de que moitos dos compoñentes a testar deben previamente pasar estudos de toxicidade, etc. Alén disto, nestes estudos non é posible controlar outros factores intrapersoais e interpersoais, como a distinta capacidade de metabolizar certos compoñentes, que poden estar influíndo na resposta que se quere medir (Gil-Sánchez *et al.*, 2020).

En canto aos modelos animais, utilízanse roedores, cánidos, monos ou animais do sector porcino, con diferentes características, o que os convirte en máis ou menos axeitados segundo o obxectivo da investigación (Hugenholtz & de Vos, 2018). Por exemplo, os roedores múridos son unha especie moi importante en canto a modelos intestinais, posto que a microestrutura do intestino humano é practicamente idéntica á destes animais (Jung & Kim, 2022). Ademais, estes animais tamén conteñen un

ecosistema microbiano intestinal moi similar ao humano, aínda que a proporción de especies bacterianas é moi diferente, o cal complica unha boa replicación dos datos, e provoca unha imposibilidade de realizar unha comparación directa dos mesmos (Jung & Kim, 2022). Por outro lado, o intestino porcino ten un notable parecido co intestino humano, polo que os modelos porcinos son moi utilizados e considéranse de alta calidade. Porén, estes animais son moi grandes e requiren unha gran dedicación de espazo e tempo para a súa utilización en estudos de laboratorio. En xeral, os modelos animais presentan unha serie de desvantaxes: implican a morte do animal ou procesos cirúrxicos con cánulas dentro dos órganos do aparato dixestivo, polo que teñen implicacións éticas (Brodkorb *et al.*, 2019), existen diferenzas entre o metabolismo humano e diferentes especies de animais, algúns patóxenos ou virus só afectan a determinadas especies, etc. Ademais, son procedementos caros e que requiren un largo tempo para a obtención de resultados, ao igual que se necesita espazo suficiente e moitas instalacións e materiais para criar os animais de experimentación (Jung & Kim, 2022). Por último, un inconveniente importante radica en que o animal é un organismo vivo no que é imposible inducir un cambio inmediato coa fin de pescudar resultados analíticos, ademais de que existen implicacións éticas e debates sobre o benestar animal, debido aos cales aumenta a tendencia a minimizar o uso de animais con fins investigadores (Lunney, 2007).

Por outro lado, no ano 2010 publicouse a Directiva Europea 2010/63/UE do 22 de setembro de 2010 relativa á protección dos animais utilizados para fins científicos, na que se recolle a necesidade de evitar os estudos con animais sempre que sexa posible, priorizando os enfoques *in vitro*.

Por todas estas razóns, desenvolvéronse os modelos *ex vivo* e *in vitro*. Os modelos *ex vivo*, pola súa parte, constitúen un modelo de transición entre os modelos *in vivo* e *in vitro*. Consisten en trasladar ao laboratorio o intestino enteiro ou texidos específicos, acompañados dun sistema de cultivo que permite a súa supervivencia e, sobre todo, a súa actividade (Jung & Kim, 2022). Polo tanto, como vantaxe, une as características dos modelos *in vivo* e *in vitro*, pois permite ter unha composición, estrutura e ecosistema tisulares completos, ao tempo que pode realizarse unha observación directa. Porén, estes modelos requiren técnicas de alto nivel para un cultivo satisfactorio e unha función intestinal prolongada, ademais de que o intestino está exposto a contaminantes durante todo o proceso e non se teñen en conta as diferenzas anatómicas e fisiolóxicas entre especies (Jung & Kim, 2022). Isto provoca unha limitada extrapolación dos resultados a poboación humana, ademais de que este tipo de modelos non permiten evadir as consideracións éticas, pois os órganos e texidos

extráense de animais, e nalgúns casos inclusive de humanos. Os estudos con modelos *ex vivo* utilízanse para investigar o transporte de fármacos a través de barreiras intestinais, as hormonas intestinais ou o metabolismo, entre outros (Ripken & Hendricks, 2015).

Por outro lado, desenvolvéronse os modelos *in vitro,* coa fin de intentar simular algunha das partes do TGI humano ou mesmo, o sistema completo na súa totalidade, e así poder avaliar diferentes aspectos do metabolismo dos compoñentes a testar como pode ser a biodispoñibilidade de compostos bioactivos e factores que a poden afectar como a matriz dun alimento ou o impacto destes compoñentes na microbiota intestinal, entre outros. Estes estudos *in vitro* teñen un bo poder de predición en humanos, ademais de que son máis fáciles de utilizar, e eliminan o inconveniente das variacións intra e interindividuais (Jung & Kim, 2022). As consideracións éticas redúcense, xa que, como moito, só se requirirá usar algunha mostra humana, como é o caso de mostras de feces humanas para estudar neles o impacto na microbiota intestinal.

Por estas razóns, a utilización de modelos *in vitro* en detrimento dos *in vivo* xa se leva a cabo dende fai varias décadas (Brodkorb *et al.*, 2019), pois comezaron a desenvolverse dende finais do século XX (Sensoy, 2021). Porén, dentro dos modelos *in vitro*, existen modelos dinámicos ou estáticos:

- Os **modelos estáticos** constitúen unha aproximación simplificada das condicións fisiolóxicas do proceso de dixestión, establecendo unhas condicións determinadas de pH, temperatura, concentración de enzimas e sales biliares, etc, ademais de realizarse cada unha das partes do proceso de forma independente. Por exemplo: a mastigación realízase por un lado, a simulación estomacal por outro, etc. Estes modelos, ademais, poden representar unha das partes en concreto, aquela que interese para o estudo, e non todo o TGI, pero non poden producir as forzas mecánicas e as condicións dinámicas que sofren os alimentos durante o proceso no TGI. Estes modelos poden resultar máis prácticos, baratos e viables cando se pretende analizar unha gran cantidade de mostras, e poden utilizarse para avaliar os efectos das condicións da dixestión, da composición e da estrutura dos alimentos ou do procesado dos alimentos, entre outros. Non obstante, como xa se adiantou, teñen limitacións, como a non posibilidade de imitar as condicións cambiantes do TGI, a absorción, a competencia de nutrientes ou compoñentes alimentarios no lugar de absorción... (Alegría *et al.,* 2015). Exemplos destes modelos estáticos son “os batch culture” que, tal e como se mostra na imaxe, consisten nuns recipientes de fermentación onde, baixo unhas determinadas condicións de pH, temperatura e atmosfera, se

inocula nun medio de cultivo a mestura de microorganismos que van ser modificados polo substrato (normalmente feces de individuos) e onde, unha vez inoculado, se incorpora o composto/alimento a analizar. Un esquema referente ao seu funcionamento pode observarse na figura 1.

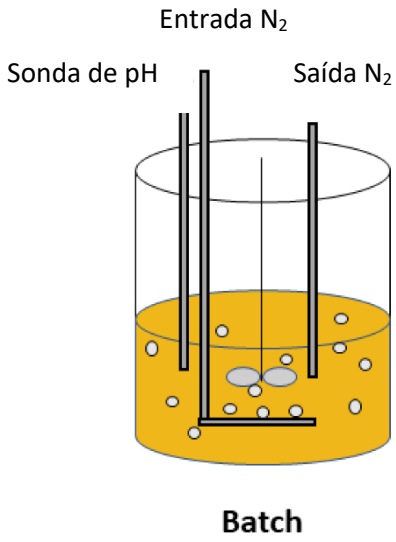

Figura 1. Esquema simplificado dun sistema "batch culture" (elaboración propia)

- Pola súa parte, os **modelos dinámicos**, son capaces de simular as variacións das respostas fisiolóxicas, é dicir, as variacións dos parámetros do pH, temperatura, secreción de enzimas e sales biliares, movementos peristálticos, tempos de retención, composición de fluídos gastrointestinais, diversidade da microbiota, metabolismo do colon, etc., ao longo das diferentes etapas da dixestión e do tempo do proceso (Tamargo *et al.*, 2017; Gil-Sánchez *et al.*, 2020). Polo tanto, estes últimos simulan con maior precisión e exactitude os procesos dixestivos e as variacións que se producen, xunto coas súas consecuencias, polo que poden servir para avaliar as transformacións que sofren os alimentos e/ou ingredientes alimentarios durante o seu tránsito polo TGI, e tamén para determinar os posibles cambios na composición e funcionalidade da microbiota intestinal como consecuencia dos distintos tipos de alimentos inxeridos (Tamargo *et al.*, 2017), entre outras aplicacións. Son sistemas que normalmente implican unha continuidade entre as partes do TGI a estudar. Exemplos destes modelos son: o Modelo Gastrointestinal TNO, Simulador Do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano, o Simulador Gastrointestinal Dinámico, Enxeñaría de Estómago e Intestino Delgado entre outros, sistemas que se describirán posteriormente no apartado 1.1.

Aínda que os modelos *in vitro* son equipos moi prometedores, teñen vantaxes e inconvenientes. Por un lado, facilitan a toma de mostra en rexións de difícil acceso cando se trata de estudos en humanos ou animais, como poden ser o estómago, o intestino delgado ou o colon, e son moi versátiles, ademais de que, no caso dos simuladores dinámicos, como xa se comentou, é posible a variación das distintas variables fisiolóxicas. En comparación cos estudos *in vivo*, son máis rápidos, menos custosos e teñen maior capacidade de reprodución debido as súas condicións estandarizadas (Sensoy, 2021). Porén, tamén presentan obxeccións, entre as cales destacan a súa complexidade e o elevado costo de instalación e posta a punto (Tamargo *et al.*, 2017). Ademais, algúns autores como Siegel *et al.* (1988) e Guerra *et al.* (2016) citan limitacións como a limitada imitación do que é o bolo alimenticio, debido a que non se simula fielmente o proceso de mastigación, ou a limitada imitación do baleirado gástrico diferencial entre sólidos e líquidos, como ocorre no estómago humano. No entanto, algúns simuladores gastrointestinais xa permiten realizar estas simulacións, como o ESIN, que pode imitar o baleirado gástrico diferencial (Guerra *et al.*, 2016), ou mesmo o GIDIS, simulador gastrointestinal que se desenvolve neste traballo, e que integra a mastigación na simulación.

Tamén cabe comentar que os modelos dinámicos poden ser mono-compartimentais ou multi-compartimentais, segundo a simulación se realice só nunha soa sección ou en varias, respectivamente. Os modelos dinámicos multi-compartimentais a miúdo inclúen o compartimento gástrico e o do intestino delgado, pero poucos inclúen o colon, como se detallará máis adiante (Sensoy, 2021)

A utilización de simuladores gastrointestinais en novos estudos e proxectos poderá carrear múltiples beneficios en canto á innovación nos tratamentos dietéticos de diferentes condicións ou patoloxías, co impacto a nivel económico que isto implica. Isto pode relacionarse con algúns dos Obxectivos de Desenvolvemento Sostible (ODS) das Nacións Unidas, como o obxectivo tres, que ten coma fin garantir unha vida sa e promover o benestar para todos en todas as idades (United Nations, 2015), pois os estudos en simuladores gastrointestinais están destinados, no seu conxunto, a avaliar o estudo de diferentes compoñentes presentes nos alimentos co obxectivo de obter un consumo seguro e saudable para todas as persoas. Ademais, tamén pode relacionarse cos obxectivos oito e nove, que teñen coma fin promover o crecemento económico inclusivo e sostible e lograr niveis máis elevados de produtividade económica mediante a modernización tecnolóxica e a innovación, e construír infraestruturas resilientes, promover a industrialización sostible e fomentar a innovación, respectivamente (United

Nations, 2015). Os simuladores gastrointestinais dinámicos son, sen dúbida, equipos que fomentan a innovación e, polo tanto, implican un crecemento económico.

1.1. Tipos de simuladores gastrointestinais dinámicos

Dende as últimas décadas do século pasado, desenvolvéronse varios simuladores gastrointestinais de diferentes características. Os pioneiros foron o denominado "Modelo Gastrointestinal TNO 1" (do inglés *TNO Gastro-Intestinal Model 1,* TIM-1) e o "Simulador Do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano" (do inglés *Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem*, SHIME), que se crearon nos primeiros anos da década de 1990 e foron os primeiros en validarse (Molly *et al.,* 1993; Minekus *et al.,* 1995). Logo, na segunda década dos anos 2000, ocorreu un incremento do interese por este tipo de equipos.

Comezando polos máis antigos, o **SHIME** desenvolveuse na universidade de Gante, Bélxica, co obxectivo principal de simular o ecosistema microbiano do TGI (Molly *et al.*, 1993). Contén cinco reactores que simulan o estómago, o intestino delgado e as tres rexións do intestino groso (Sensoy, 2021), e cada un deles contén oito portos para entrada e saída de medio, a toma de mostra da fase líquida e os gases do reactor, un eléctrodo de pH, o control do pH (ácido ou básico) e a insuflación do reactor (Molly *et al.*, 1993). Contén bombas peristálticas que facilitan a transferencia controlada do contido e os xugos dixestivos entre os reactores, e o tempo de tránsito, así como os valores de pH e temperatura, poden controlarse (Molly *et al.*, 1993). Ademais, créase un ambiente de anaerobiose mediante a insuflación de nitróxeno cada 15 minutos, e pode incorporarse a microbiota humana (Sensoy, 2021). Non obstante, algunhas desvantaxes que se sinalan deste equipo pasan pola carencia de módulos de diálise ou polo uso de axitadores magnéticos, pois non simulan os movementos peristálticos dixestivos de forma axeitada (Sensoy, 2021). Un esquema do seu funcionamento pode observarse na figura 2. O mesmo grupo de investigación creou variantes deste equipo con distintos fins. Por exemplo, o Mucus-SHIME contén un compartimento mucoso cuxa fin pasa por avaliar os microorganismos que se adhiren selectivamente á capa mucosa que recubre a parede intestinal e ten un papel esencial como barrera contra microorganismos (Van den Abbeele *et al.*, 2013). Por outro lado, cabe comentar tamén o desenvolvemento do TWINSHIME, sistema no cal dous sistemas SHIME idénticos funcionan en paralelo e en condicións idénticas, para conseguir unha comparación directa de dúas mostras ao mesmo tempo (García-Villalba *et al.*, 2017).

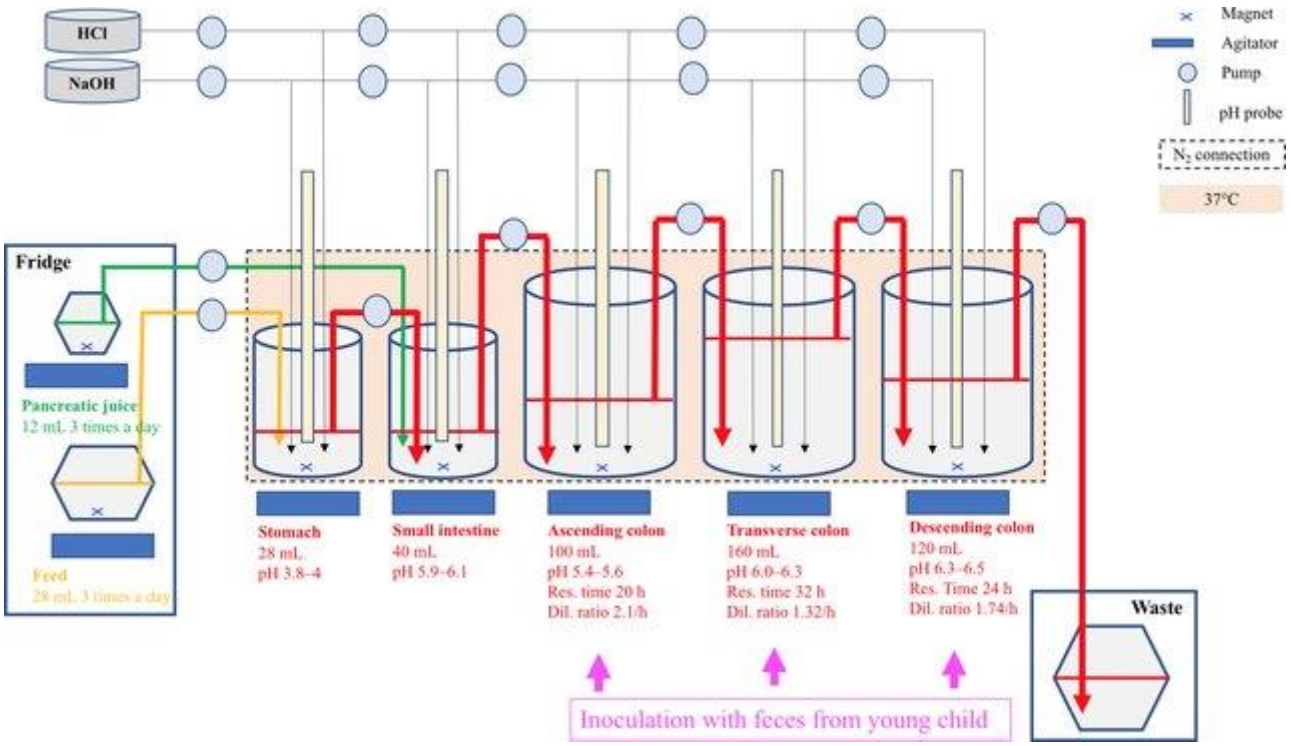

Figura 2. Representación esquemática do modelo SHIME **(**Bondue *et al.,* 2020)

O **TIM-1** foi desenvolvido polo TNO Nutrition and Food Research Center de Zeist, Países Baixos, como un sistema dinámico multi-compartimental que simula o proceso dixestivo a través do TGI, pois permite simular as condicións fisiolóxicas que cambian co tempo e a localización, como o tempo de tránsito, o pH, a absorción de nutrientes e auga, a composición e taxa de secreción de fluídos dixestivos, etc (Minekus *et al.*, 1995). É un sistema formado por catro reactores, que son camisas de vidro cunha membrana interior flexible, entre as cales se bombea auga. A presión deste líquido provoca o movemento da membrana interior, simulando desta maneira as contraccións peristálticas, ao tempo que a temperatura da auga tamén permite simular a temperatura corporal. Os reactores pretenden simular o estómago e as tres partes do intestino delgado, que son o duodeno, xexuno e íleo, e atópanse conectados mediante válvulas peristálticas que provocan a transferencia de contido segundo o indicado no ordenador que controla o sistema (Sensoy, 2021). Este modelo pode observarse na figura 3. No entanto, existen outros modelos deste equipo, o TIM-2, o TinyTIM e o TIM-agc. Pola súa parte, o TIM-2 é un sistema deseñado para simular o intestino groso, usando doazóns fecais de voluntarios, mentres que o TinyTIM é unha versión simplificada do TIM-1, e o TIM-agc funciona como un modelo gástrico. Aínda que os distintos modelos son complementarios entre sí, non funcionan conxuntamente (Bellmann *et al.*, 2016).

Figura 3. Simulador gastrointestinal TIM-1. Os recipientes A, B, C e D constitúen os compartimentos gástrico, duodenal, xexunal e ileal, respectivamente. Os módulos E son unidades de diálise de membrana de fibra oca semipermeable, F son válvulas peristálticas, G son válvulas ileocecais, H son eléctrodos de pH, I é o sensor de temperatura, J son entradas de secrecións gástricas, K é a entrada de secrecións duodenais, L e M son entradas de secrecións de bicarbonato e N son sensores de volume (Kheadr *et al.,* 2010)

Como se comentaba anteriormente, outros simuladores foron desenvolvidos más recentemente. Por exemplo, o **"SIMulador GastroIntestinal Dinámico" (SIMGI)**, que foi desenvolvido no Instituto de Investigación en Ciencias da Alimentación (CIAL) (Madrid, España) (Barroso *et al.*, 2015). Ao igual que algún dos outros simuladores gastrointestinais, consta de varios compartimentos, que son o estómago, o intestino delgado e o colon ascendente, transverso e descendente, gobernados por un autómata, e que poden operar de forma conxunta ou independente (Barroso *et al.*, 2015). O sistema permite controlar, entre outros, a temperatura, o pH, a anaerobiose, tanto no intestino delgado como no colon, ou o tempo de baleirado no intestino delgado, entre outros (Tamargo *et al.*, 2017). O estómago está composto por unha membrana flexible de silicona recuberta por dous recipientes de vidro, entre os cales se bombea auga a 37ºC (Sensoy, 2021), polo que a mestura do contido estomacal realízase simulando os movementos peristálticos grazas ao movemento que produce o bombeo da auga nesta parede flexible (Tamargo *et al.*, 2017; Barroso *et al.*, 2015). Isto non ocorre no intestino delgado e o colon, nos que se mesturan os fluídos mediante axitación mecánica regulable (Tamargo *et al.*, 2017). Estes compartimentos están en axitación continuamente, e traballan baixo condicións anaerobias e de pH controlado (Sensoy, 2021). Por outra parte, dispón de diferentes puntos de toma de mostra en cada un dos

compartimentos coa fin de poder levar a cabo análisis bioquímicos e microbiolóxicos (Sensoy, 2021), pois presenta a posibilidade de reproducir a microbiota intestinal, mediante a inoculación dos recipientes de fermentación colónicos con microbiota intestinal humana (Tamargo *et al.*, 2017). Na figura 4 obsérvase unha fotografía do SIMGI.

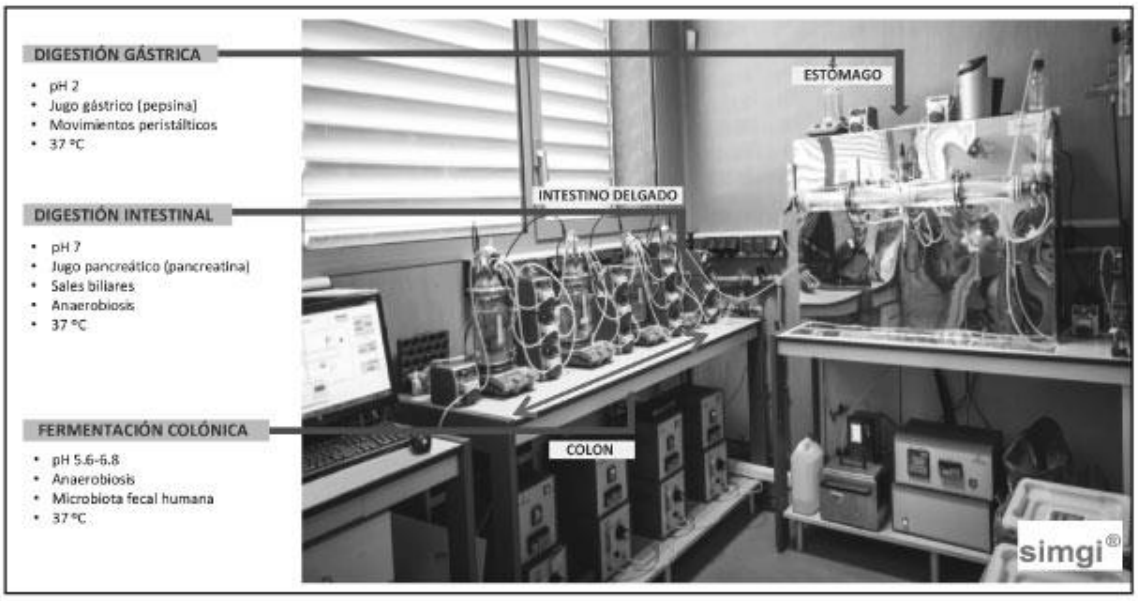

Figura 4. Simulador gastrointestinal dinámico SIMGI (Tamargo *et al.,* 2017)

Outro modelo de simulador gastrointestinal multi-compartimental foi desenvolvido en Clermont-Ferrand (Francia), na Universidade de Auvergne. Este modelo dinámico controlado por ordenador recibe o nome de "Enxeñaría de Estómago e Intestino Delgado" (do inglés ***Engineered Stomach and Small INtestine*, ESIN**). Reproduce a fisioloxía do estómago e o intestino delgado humanos, incluídos o pH, os tempos de tránsito, a mestura do quimo, as secrecións dixestivas e a absorción pasiva dos produtos da dixestión (Guerra *et al.*, 2016). Contén seis recipientes: un depósito de comida, un contedor de saliva, o estómago, o duodeno, o xexuno e o íleo. Ademais, pretende superar algunhas limitacións presentes en outros simuladores gastrointestinais anteriores, como o uso de alimentos moídos ou o baleirado non diferencial de líquidos e sólidos no estómago (Sensoy, 2021). Para isto, a redución do tamaño de partícula da comida utilizada realízase no propio equipo, simulando a mastigación sen permitir o paso do bolo alimenticio ao estómago ata que as partículas teñen un tamaño medio de 1 a 8 mm. Por outro lado, para superar a limitación doutros simuladores en canto ao baleirado gástrico, o modelo tamén pretende simular a natureza bifásica do baleirado gástrico observada *in vivo*, na que o estómago require dun certo tempo para procesar

as partículas ata que son o suficientemente pequenas para ser manexadas como líquido e pasar polo píloro (Siegel *et al.*, 1988). No modelo, os líquidos e as partículas sólidas baléiranse mediante bombas peristálticas diferentes, polo que se consegue o baleirado das fraccións líquidas sen fase de retardo, e o baleirado das fraccións sólidas cunha fase de retardo de 30 minutos (Guerra *et al.*, 2016). Na figura 5 pódese observar a arquitectura do estómago do ESIN, que permite realizar o tipo de simulación antes mencionada.

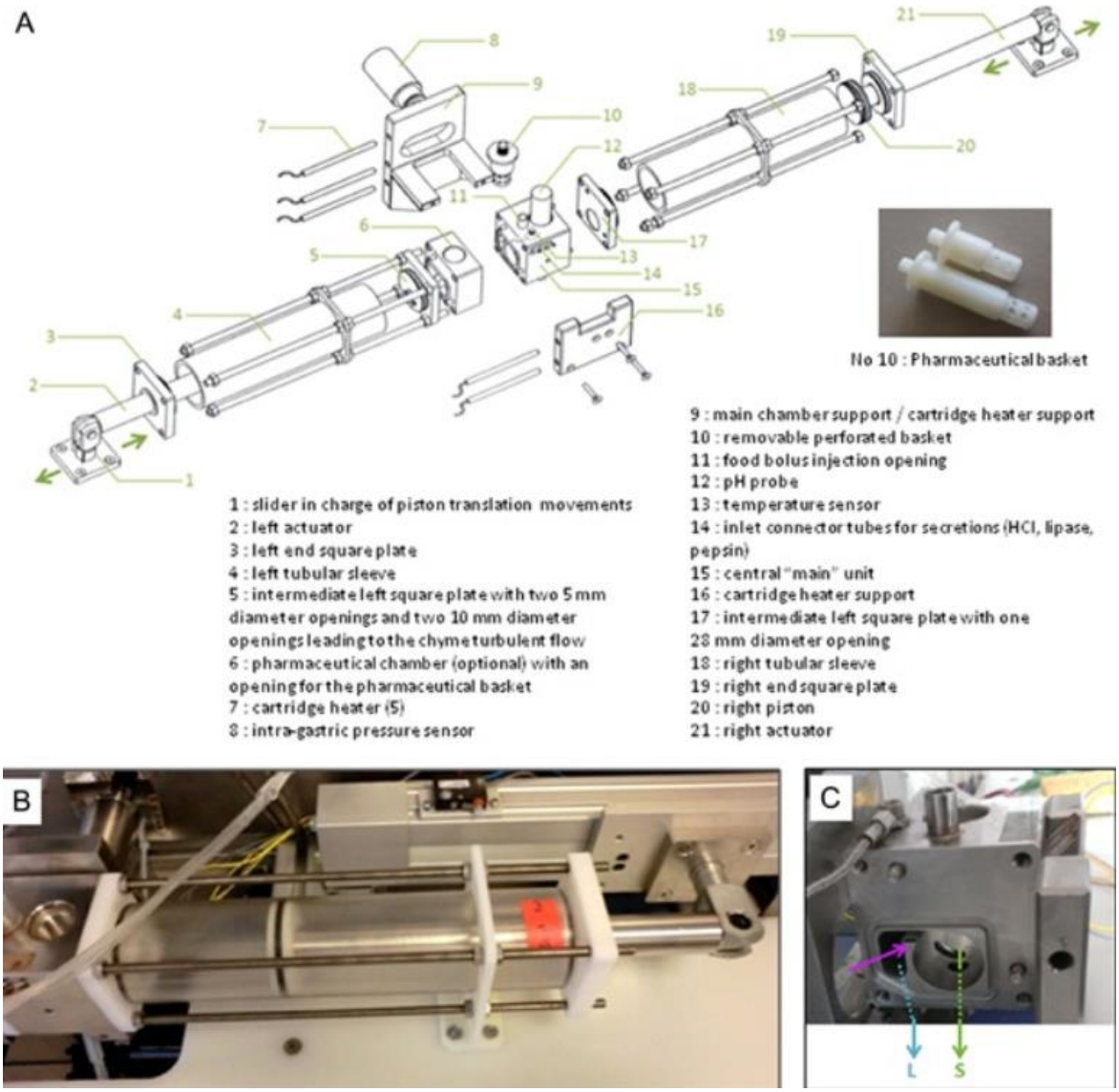

Figura 5. Arquitectura do ESIN. No apartado A pode verse un esquema do estómago e a fotografía das cestas farmacéuticas. No apartado B aparece unha fotografía do estómago e no apartado C ensínase a fendedura e os portos de saída que permiten o baleirado gástrico diferencial (Guerra *et al.,* 2016)

Tamén en Francia, concretamente en París, no Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA), desenvolveuse o "Sistema Dinámico *In*

Vitro" (do inglés *In Vitro Dynamic System*, DIDGI), que simula o estómago e o intestino delgado con dous recipientes con camisa de vidro, dentro da cal se bombea auga a temperatura controlada (Sensoy, 2021). Unha das novidades coas que conta, respecto a outros simuladores gastrointestinais, é a inclusión dunha membrana con ocos de 2 mm entre o compartimento gástrico e o intestinal, que permite imitar o sistema de cribado por tamaño de partícula levado a cabo polo píloro na dixestión humana. As condicións fisiolóxicas necesarias para a simulación do proceso dixestivo contrólanse a través de ordenador (Ménard *et al*., 2014). Na figura 6 pódese observar este sistema.

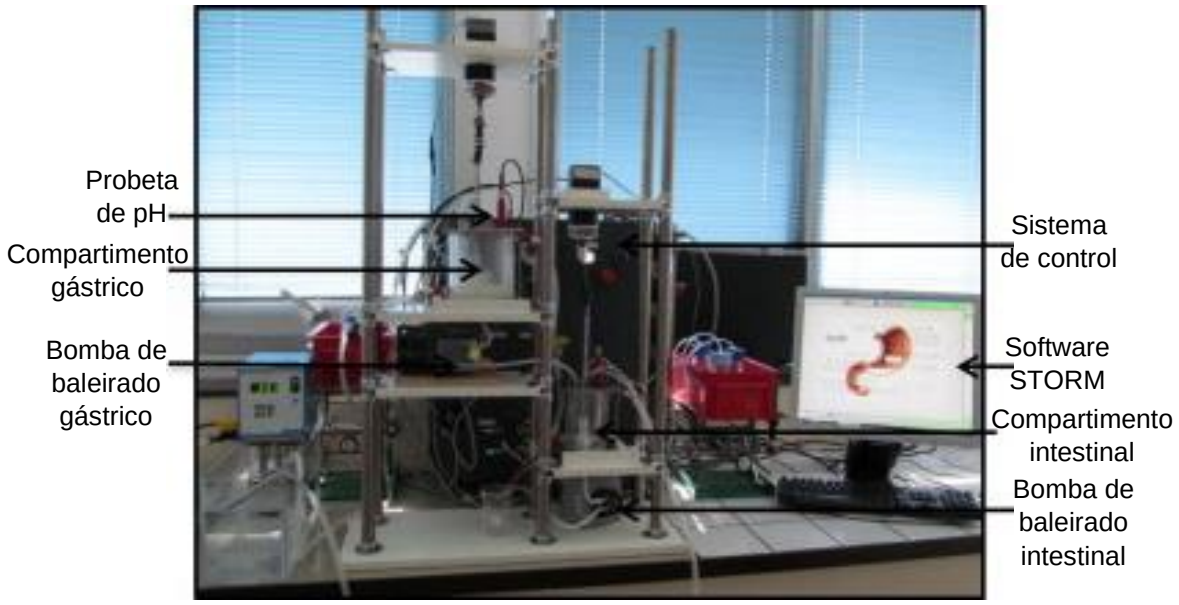

Figura 6. "Sistema Dinámico *In Vitro*" (DIDGI) (Ménard *et al.,* 2014)

Nesta liña de simulación do tamaño real da comida inxerida tamén se creou o "Modelo Gástrico Dinámico" (do inglés ***Dynamic Gastric Model*****, DGM**), neste caso no Instituto de Investigación Alimentaria de Norwich, Inglaterra (Dupont *et al*., 2019). Neste caso, o modelo ten tres estados de funcionamento. No primeiro estado, simúlase o procesado da comida e a mestura cos xugos dixestivos no estómago proximal. No segundo estado, simúlanse as forzas fisiolóxicas que permiten a trituración do alimento e, por último, no estado tres, simúlase o duodeno (Wickham *et al*., 2012; Thuenemann *et al.*, 2015). Na figura 7 pode observarse un esquema a escala e unha fotografía do simulador DGM.

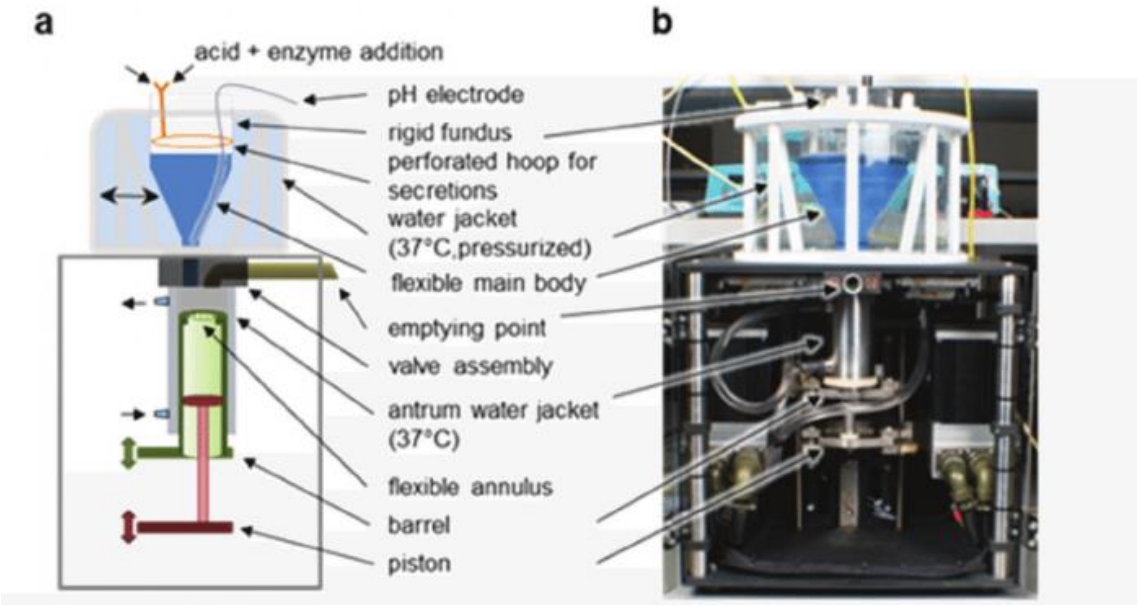

Figura 7. "Modelo Gástrico Dinámico" (DGM) (Mandalari *et al.,* 2016)

Ao igual que o descrito anteriormente, existen algúns simuladores dinámicos que pretenden replicar a parte gástrica principalmente, complementada en ocasións con pequenas partes adxacentes. Este é o caso de simuladores como o "Simulador Gástrico Humano" (do inglés *Human Gastric Simulator*, HGS) (Kong & Singh, 2010) ou o" Modelo De Simulación Gástrica Dinámica" (do inglés *Dynamic Gastric Simulation Model*, DGSM) (Chen *et al*., 2011), creados na universidade de California, en Estados Unidos, e na universidade de Leeds, en Inglaterra, respectivamente. Ambos poden simular as contraccións peristálticas, as secrecións e o baleirado gástrico observados no estómago *in vivo* (Kong & Singh, 2010; Chen *et al*., 2011). O simulador gástrico humano HGS foi específicamente deseñado para producir un movemento peristáltico continuo similar ao observado no estómago *in vivo*. Así, perséguese conseguir que as forzas mecánicas que actúan sobre o bolo alimenticio sexan moi similares ás observadas *in vivo*, proporcionándose así unha mellor simulación (Kong & Singh, 2010). A súa anatomía pode verse na figura 8.

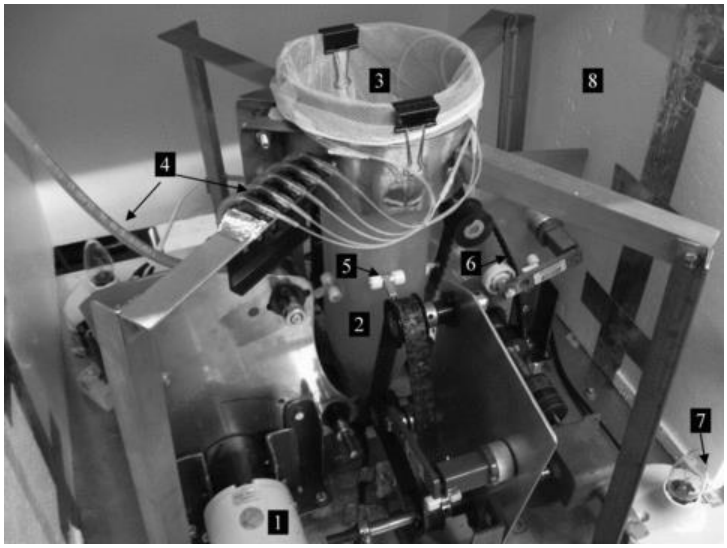

Figura 8. "Simulador Gástrico Humano" (HGS). (1) Motor; (2) forro de látex; (3) bolsa de malla; (4) tubo de secreción; (5) rodete; (6) cinto; (7) lámpada para control de temperatura; (8) illamento de espuma plástica (Kong & Singh, 2010)

Moi similares aos anteriores son, por exemplo, o Modelo Dinámico Casi Real *In Vitro* Do Estómago Humano (do inglés *Near real Dynamic In Vitro Human Stomach System*, new DIVSH), creado no Laboratorio Clave de Enxeñaría Química Ecolóxica de Suzhou, na universidade de Soochow (Suzhou, China) (Wang *et al*., 2019), o "Sistema Dixestivo Gástrico Artificial" (do inglés *Artificial Gastric Digestive System*, AGDS), creado tamén na China, na Facultade de Ciencias da Alimentación e Biotecnoloxía, na universidade de Zhejiang Gongshang (Sensoy, 2021), ou o "Simulador De Dixestión Gástrica Humano" (do inglés *Human Gastric Digestion Simulator*, GDS), creado no Instituto de Investigación Alimentaria de Ibaraki, Xapón (Kozu *et al*., 2014). Este último afonda aínda máis na anatomía do estómago, pois simula a xeometría trapezoidal do antro humano, cun diámetro menor cara o píloro. Nel, mediante unha cámara de vídeo e unha ventá transparente, pode seguirse o proceso de desintegración dos alimentos e o proceso de dixestión na súa totalidade, podendo así analizar os cambios nas partículas dos alimentos (Sensoy, 2021).

Por último, en contraposición cos simuladores gástricos, o simulador "Colon Artificial" (do inglés *ARtificial COlon*, ARCOL) é un colon artificial creado en Holanda que, grazas á utilización de feces de voluntarios sas, a insuflación con nitróxeno, unha membrana de fibras e o control informático, pode simular o pH, a temperatura corporal, o tempo de retención, as condicións anaerobias e a absorción de auga e metabolitos de fermentación (Cordonnier *et al*., 2015; Sensoy, 2021).

Todos estes simuladores dinámicos desenvolvidos de cara a avaliar o efecto de certos compoñentes ou alimentos, así como o proceso que poden sufrir no TGI humano, demostran o interese crecente en utilizar estes sistemas en estudos preclínicos. Isto é así debido á súa capacidade de reprodución dos resultados, á posibilidade de variar as condicións de proceso simulando diferentes condicións fisiolóxicas, á facilidade de toma de mostra... e debido a que, salvando as limitacións que os caracterizan, como a imitación de certos aspectos da dixestión, que mesmo aínda faltan por coñecer, proporcionan resultados correlativos con datos *in vivo*, o que da unha idea da súa utilidade, sobre todo como paso previo a estudos clínicos a grande escala.

Na táboa 1 recóllese un resumo das características máis relevantes dos principais simuladores gastrointestinais dinámicos aquí mencionados. Cabe comentar que non se incluíron aspectos como a medición e o control do pH que, sexa manual ou automaticamente, se entenden como intrínsecos ao modelos dinámicos.

Táboa 1. Táboa-resumo das características máis destacables dos principais simuladores gastrointestinais dinámicos (elaboración propia)

	Boca	*Estómago*	*Intestino delgado*	*Colon*	*Baleirado diferencial de sólidos e líquidos*	*Toma de mostra*	*Anaerobiose*	*Absorción*
SHIME	Non	Non	Si (duodeno e xexuno separados de íleo)	Si (tres seccións por separado)	Non	Si	Si, no colon	Non
TIM-1	Non	Si	Si (tres sección separadas)	Non	Non	Non	Non	Si
SIMGI	Non	Si	Si	Si (tres seccións por separado)	Non	Si	Si, no intestino delgado e no colon	Non
ESIN	Si	Si	Si (tres seccións separadas)	Non	Si	Si	Non	Si
DIDGI	Non	Si	Si	Non	Non	Non	Non	Non
DGM	Non	Si (dúas partes diferenciadas)	Só o duodeno	Non	Non	Non	Non	Non
HGS	Non	Si	Non	Non	Si	Non	Non	Non
DGSM	Non	Si	Non	Non	Si	Non	Non	Non
New DIVSH	Si	Si	Non	Non	Si	Non	Non	Non
AGDS	Non	Si	Non	Non	Non	Non	Non	Non
GDS	Non	Si	Non	Non	Non	Non	Non	Non
ARCOL	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Si	Si (sistema de diálise no colon)

2. Obxectivo

O obxectivo deste traballo é o desenvolvemento e optimización dun novo modelo dinámico *in vitro* para a simulación do sistema dixestivo humano e a súa aplicación nas ciencias da saúde. Para levalo a cabo, e como en todo traballo experimental, foi necesario realizar unha revisión bibliográfica da literatura científica máis relevante sobre, por un lado, as condicións fisiolóxicas baixo as que se leva a cabo a dixestión humana e, por outro lado, o funcionamento doutros simuladores dixestivos, tanto dinámicos como estáticos, así como a revisión dos protocolos ou normas referentes a eles, coa fin de desenvolver un sistema gastrointestinal dinámico diferente aos xa existentes e poder optimizar os seus parámetros do xeito máis semellante posible á dixestión humana.

3. Materiais e métodos

A dixestión *in vitro* oral, gástrica e do intestino delgado levouse a cabo en concordancia co protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019). Por tanto, as solucións utilizadas como líquidos simuladores dos fluídos existentes en cada sección do sistema dixestivo preparáronse de acordo a este documento. Os reactivos necesarios, de grado reactivo, foron: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Panreac, Barcelona, España), solución de NaOH 1N (Merck, Darmstadt, Germany), solución de HCl 1N (Merck, Darmstadt, Germany), KCl (Panreac, Barcelona, España), $KH_2PO_4 \cdot 3H_20$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), NaCl (Panreac, Barcelona, España), $MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$ (Panreac, Barcelona, España), $(NH_4)_2CO_3$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Por outro lado, as enzimas dixestivas empregadas e as sales biliares, que tamén se incluían nos líquidos simuladores, foron: α-amilasa salivar humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), pepsina porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), lipasa gástrica de extracto gástrico de coello (Lipolytech, Marseille, France), pancreatina porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e bilis bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

O medio nutritivo empregado para os ensaios no intestino groso preparouse conforme a Cardelle-Cobas *et al.* (2012) lixeiramente modificado. Para 1 litro de medio, utilizáronse: 6 g de auga peptona (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 6 g de extracto de levadura (Panreac, Darmstadt, Germany), 0,03 g de NaCl (Panreac, Barcelona, España), 0,12 g of K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,12 g de KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,03 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,03 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Panreac, Barcelona, España), 6 g de $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 6 mL de Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1,5 g de Hemin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 30 µL de vitamin K_1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1,5 g de cisteína-HCl (Merck, Darmstadt, Germany), 1,5 g de sales biliares (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), e 3 mg de Resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Na regulación do pH utilizáronse as mesmas solucións de HCl e NaOH mencionadas anteriormente. Outro material de laboratorio utilizado foi, por exemplo, vortex estándar de laboratorio, autoclave, pipetas e micropipetas, báscula, vasos de precipitados...

4. Resultados e discusión

4.1. Desenvolvemento do modelo: "GastroIntestinal DIgestion System (GIDIS)"

O "Gastrointestinal Digestion System" ou GIDIS é un equipo que se desenvolveu coa idea de mellorar a metodoloxía que se estaba a empregar no laboratorio para a simulación da dixestión gastrointestinal e a avaliación do impacto que certos compoñentes/alimentos podían exercer sobre a microbiota colónica. Esta metodoloxía consistía basicamente en empregar o consenso INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019) xunto con sistemas de fermentación tipo "batch culture". Basicamente, o que se pretendía co desenvolvemento deste sistema era integrar todos estes pasos, para poder simular a dixestión nun proceso continuo, controlando todos os parámetros necesarios (pH, temperatura, tempos de residencia, etc) e que permitise traballar con mostras fecais na parte colónica. Ademais, e posto que estes tipos de sistemas xa se estaban a utilizar por parte doutros equipos de investigación, a idea era incluír algunha parte distintiva.

Para o seu deseño foi necesario, polo tanto, facer unha busca exhaustiva na literatura científica, para determinar como foran deseñados os sistemas dinámicos xa existentes e decidir as partes das que se quería que contase, así como buscar unha empresa que puidese levar a cabo a execución do mesmo.

A empresa encargada da execución do proxecto en base as nosas peticións e en base á información dos modelos existentes deseñou varios modelos que se foron mellorando nas distintas reunións realizadas. Así, na figura 9 móstranse dous predeseños do simulador gastrointestinal. Na parte superior, un sistema moi similar aos xa existentes constando do estómago, intestino delgado e 3 reactores que simulan o colon ascendente, transverso e descendente. Na parte inferior obsérvase unha segunda opción que mellora a anterior, onde se propón un sistema de recirculación en continuo mediante bombas peristálticas, coa idea de simular mellor os movementos peristálticos do intestino, no canto dun simple axitador magnético. Ademais, no intestino delgado incorporouse un sistema de diálise que permite nalgúns casos, dependendo do tamaño dos compostos a testar, simular a absorción no intestino delgado.

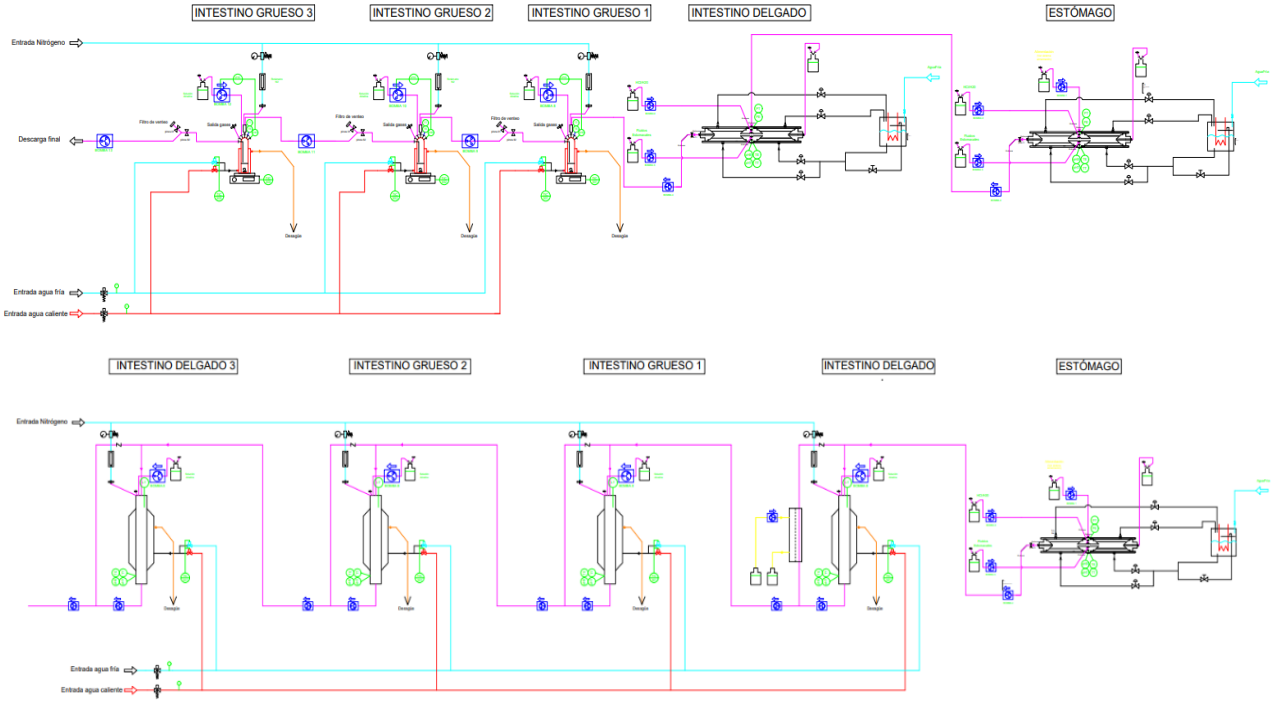

Figura 9. Predeseños do simulador gastrointestinal na fase de desenvolvemento (elaboración por parte de Bioprocess Technology S.L.)

Posteriormente incorporóuselle ao sistema a parte da boca, e incluíronse as distintas partes nunha estrutura con rodas de modo que os equipos quedasen na parte dianteira e os servizos (baño de auga, entrada de nitróxeno, etc.) quedasen na parte traseira. Na figura 10 pode verse sobre plano como quedou o deseño final.

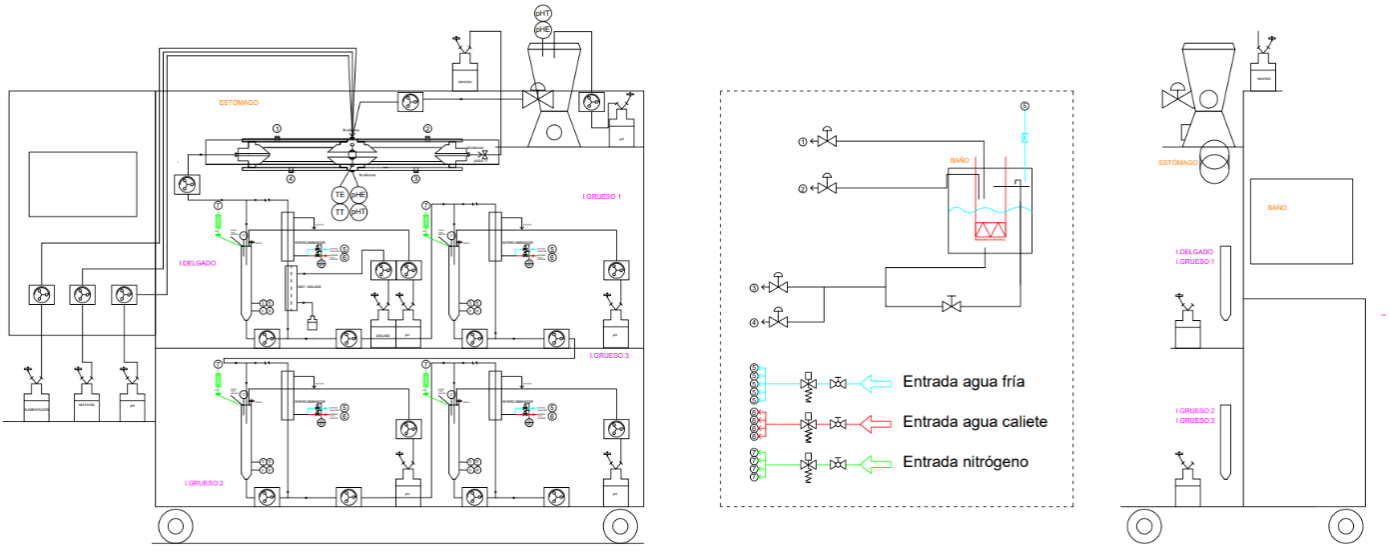

Figura 10. Deseño final do GastroIntestinal DIgestion System (GIDIS) sobre plano (elaboración por parte de Bioprocess Technology S.L.)

Deste modo, o GIDIS integra a simulación dixestiva dende a boca ata o ano, é dicir, todo o aparato dixestivo, a diferenza de moitos simuladores gastrointestinais existentes ata a data, sobre todo os máis antigos, que só simulan a parte alta ou a fermentación colónica, por separado.

Integra a mastigación, de gran utilidade para as mostras sólidas, xa que desta maneira non hai necesidade de realizar a trituración da mostra antes de introducila no simulador. Así, os alimentos poden introducirse no GIDIS da mesma maneira que se inxiren, mesturándose coas solucións enzimáticas da boca (principalmente α-amilasa) ao tempo que se trituran, reproducindo de maneira máis similar a mastigación e posterior deglutición do bolo alimenticio ao estómago. Outro aspecto diferente do GIDIS é que o intestino delgado e os tres reactores que compoñen as tres partes do intestino groso integran unha bomba peristáltica cada un, que permiten a recirculación continua do contido, polo que se crea un movemento peristáltico que semella o movemento ao que é sometido o contido intestinal no seu tránsito polo intestino delgado e groso. Ademais o intestino delgado ten integrado un sistema de diálise para a simulación da absorción intestinal, aspecto que pola súa dificultade é obviado noutros simuladores gastrointestinais. No entanto, ao integrar este modulo de diálise, a opción de integrar microorganismos neste punto quedou descartada.

De maneira descritiva, pódese dicir que o GIDIS é un simulador dinámico multi-compartimental que ten varias partes, análogas á estrutura do aparato dixestivo, pois inclúe a boca, o estómago, o intestino delgado e o colon, coas súas tres partes diferenciadas (ascendente, transverso e descendente). Todas as partes están gobernadas por un ordenador mediante un software SCADA coa aplicación informática BIOPRO PLANT e conectadas entre elas mediante sondas e bombas, podendo operar de forma conxunta ou independente. Na figura 11 pode verse a páxina principal da aplicación informática BIOPRO PLANT.

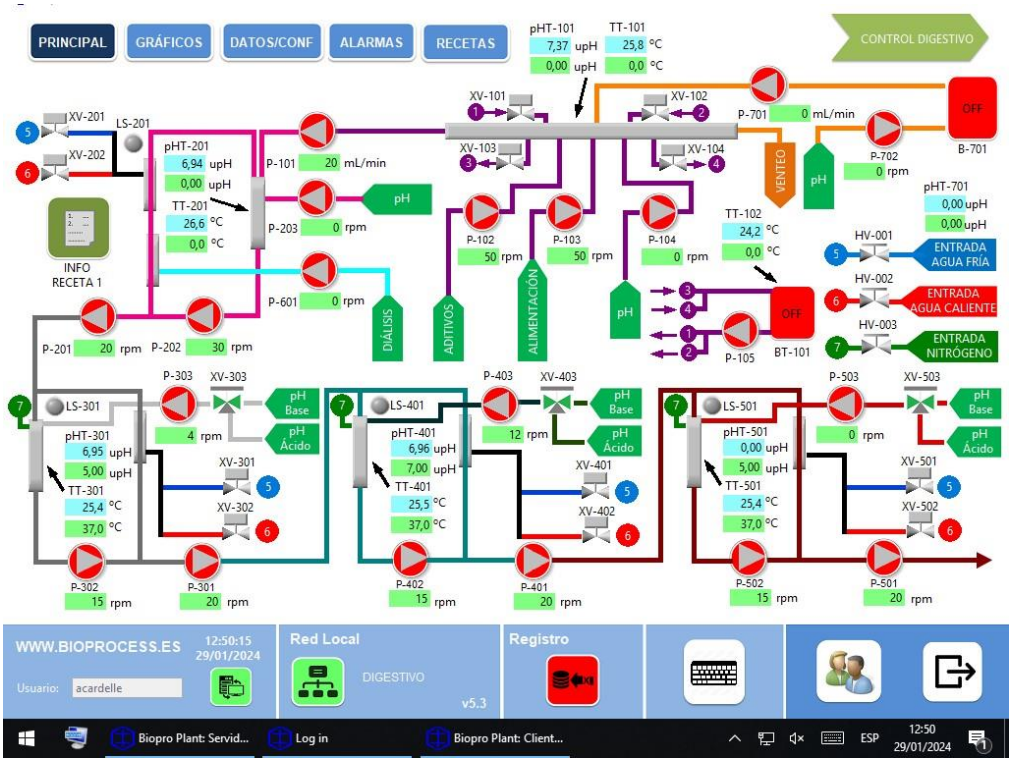

Figura 11. Vista da páxina principal da aplicación BIOPRO PLANT no control computarizado do GIDIS (elaboración propia)

A continuación, explícase o sistema a través de cada unha das súas partes:

- **A boca:** a mastigación e a mestura co líquido simulador salivar (SSF), preparado conforme o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al,* 2019), está a cargo dunha trituradora. A integración deste paso no equipo de simulación, como xa foi comentado anteriormente, é unha novidade coa que contan poucos simuladores gastrointestinais actuais.
- **Estómago:** o contido da boca chegará ao estómago a través dunha bomba de transvasamento de maneira automática. Compónse de dous recipientes de metacrilato en cuxo interior se atopa unha membrana flexible. Entre o metacrilato e a membrana bombéase auga, que cumpre dúas funcións: crear os movementos peristálticos propios do estómago e que permiten a mestura do contido estomacal co líquido simulador gástrico (SGF), preparado conforme o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al,* 2019), e establecer e manter constante a temperatura fisiolóxica do aparato dixestivo. A temperatura mantense con auga á temperatura desexada, que provén dun baño termostático que quenta e mantén a auga á temperatura de consigna. Os distintos portos situados na peza que une ambos recipientes permiten a introdución do SGF, das enzimas dixestivas necesarias para a dixestión e da solución ácida para o control do pH.

- **Intestino delgado:** esta sección componse dun reactor ao que chega o contido estomacal, que recircula continuamente a través de sondas e un intercambiador de calor, coa axuda dunha bomba peristáltica. Esta acción realízase, precisamente, para simular os movementos peristálticos que sofre o contido intestinal, unha opción nova do GIDIS que permite mellorar a simulación do proceso dixestivo porque, desta maneira, conséguese a correcta mestura do contido estomacal co líquido simulador intestinal (SIF), preparado conforme o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al,* 2019). Ademais, o contido pode atravesar un sistema de diálise, simulando desta maneira a absorción dos nutrientes no intestino delgado. Por outro lado, existe un porto de introdución de solución con pH básico para a regulación deste parámetro. As enzimas que actúan a este nivel, como a pancreatina, tamén se engaden antes de iniciarse o proceso de dixestión/absorción intestinal. A temperatura mantense por mestura de auga fría e quente, controlada por un sensor de temperatura.
- **Colon:** o colon está simulado a través das tres partes, ascendente, transverso e descendente. A estrutura e funcionamento é igual á do intestino delgado, aínda que non existe a membrana de diálise e, por outra parte, estas seccións funcionan nun ambiente anaerobio mediante a insuflación de nitróxeno, debido a que son susceptibles de inocular microbiota para simular o metabolismo bacteriano que ten lugar no colon coa comida ou composto/s dos que se quere testar o efecto sobre a mesma. Nesta sección tamén existe, para cada un dos tres reactores do colon, unha conexión para a introdución de solucións de regulación de pH, que neste caso son dúas, unha ácida e outra básica, para que, segundo o metabolismo bacteriano, o pH se regule ao desexado. A temperatura mantense da mesma maneira ca no intestino delgado.

O control da simulación da dixestión en todas e cada unha das partes realízase por ordenador a través do software, no apartado de “control dixestivo”. Aquí poden controlarse todas as bombas, tanto de transferencia como peristálticas, o baño termostático, as válvulas de entrada e saída de auga… e tamén determinar os parámetros a manter durante a dixestión, como poden ser os valores de temperatura, de pH, a velocidade en revolucións por minuto (rpm) das bombas, o caudal de transferencia nas que así o esixen, etc. Ademais, hai puntos de toma de mostra no estómago, intestino delgado e as tres partes do intestino groso. Na figura 12 pode observarse o exemplo do apartado “control dixestivo” da sección estomacal, cos parámetros que poden controlarse.

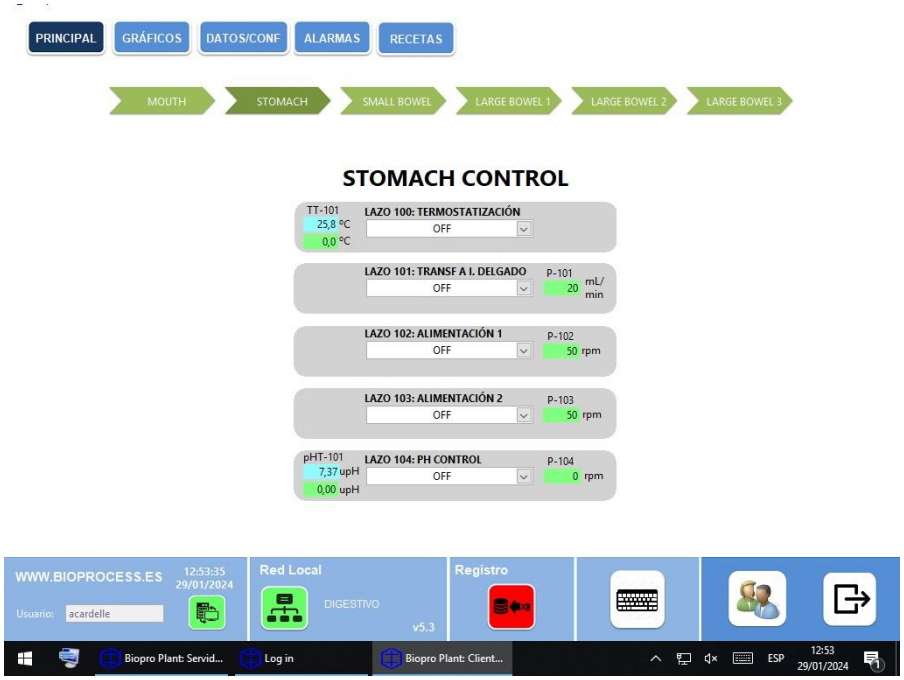

Figura 12. Vista da páxina de control dixestivo da sección estomacal no control computarizado do GIDIS (elaboración propia)

Por outro lado, o sistema informático que controla o simulador gastrointestinal tamén permite crear gráficos, nos que se poden visualizar os parámetros desexados polo operador no período de tempo que se estime oportuno, e "receitas", que é unha función do software que permite encadear as funcións que deben realizarse para levar a cabo o proceso dixestivo de forma automática. Deste xeito, debe crearse unha receita e, dentro dela, as fases necesarias. Dentro de cada fase, indícase os modos nos que deben estar cada bomba, válvula, etc. do simulador, e as condicións de salto a unha fase seguinte, que normalmente corresponderanse cun tempo marcado. Como se comenta, ao levar a cabo unha receita simplemente se cambian os modos automaticamente no apartado de "control dixestivo", polo que é recomendable realizar probas e axustar os parámetros de configuración con anterioridade, para poder enviar a orde de funcionamento automático ás bombas e válvulas, e así conseguir que as accións se realicen automaticamente, debido a que se, pola contra, se indican modos manuais, aínda que a receita se execute, as bombas e válvulas só funcionarían despois dun acendido manual por parte do operador.

4.2. Optimización do proceso de dixestión gastrointestinal

Unha vez deseñado o sistema, era necesario optimizar todos os parámetros de acordo co proceso dixestivo humano. Loxicamente, este proceso pode variar a nivel individual, pero neste caso tomamos como referencia como é o proceso "estándar" para un adulto san.

Para a dixestión da parte alta do sistema dixestivo humano tomouse como referencia o protocolo INFOGEST 2.0, dado que é un protocolo de consenso que xurdiu precisamente da necesidade de harmonizar as diferentes condicións de experimentación que se estaban a utilizar a nivel investigación para a simulación da dixestión dos alimentos/compoñentes alimentarios, e que permitise así comparar resultados. Para isto, creouse unha rede que uniu expertos multidisciplinares de máis de 35 países diferentes. Este consenso foi publicado no ano 2014, xustificando os parámetros experimentais mediante a súa relación cos parámetros observados na dixestión *in vivo* (Minekus et al., 2014). No ano 2019, Brodkorb *et al.* publicaron o coñecido como protocolo INFOGEST 2.0, que se trata dun documento baseado no anterior de Minekus *et al.* (2014), pero que clarifica diversos aspectos do protocolo orixinal, razón pola cal se entendeu como o protocolo máis axeitado para comezar a optimización dun novo simulador.

Segundo este protocolo, antes de comezar o experimento debe planificarse a toma de mostra, así como determinar experimentalmente as actividades de todas as enzimas dixestivas para utilizar as cantidades correctas en función da actividade necesaria, determinar a concentración necesaria de sales biliares, e recoméndase realizar o test de pH con unha cantidade relevante de comida, co fin de gravar as cantidades de NaOH ou HCl necesarias para acadar o pH deseado e poder axustar o pH dunha forma máis eficiente durante a dixestión, aínda que, como o GIDIS bombea solución de forma automática, este paso non foi necesario. Este protocolo indica que a dixestión correspondente á parte alta de sistema dixestivo (boca, estómago e intestino delgado) debe transcorrer de acordo coa figura 13.

Este protocolo normalmente levase a cabo en descontinuo, é dicir en diferentes matraces ou recipientes que van simulando as diferentes etapas do protocolo. No noso caso era necesario adaptalo a un sistema dinámico, é dicir, transvasando o contido de cada parte a cada momento.

Por outra parte, para a escolla dos parámetros da simulación do proceso gastrointestinal no intestino groso, consultouse a bibliografía científica existente de ensaios levados a cabo con outros simuladores, tanto os que realizan só a dixestión colónica como aqueles que a integran na súa totalidade (Cardelle-Cobas *et al.*, 2012; Barroso *et al.*, 2015; Gil-Sánchez *et al.*, 2020; Lopez-Santamarina *et al.*, 2022).

Ademais, foron consultadas publicacións científicas ou libros sobre a fisioloxía da dixestión humana para cotexar por exemplo, os tempos de residencia dos compostos/alimentos en cada unha das partes. Aínda así, coñecer á perfección o funcionamento do aparato dixestivo durante o proceso de dixestión é imposible ata o momento, precisamente debido ás limitacións dos estudos *in vivo*. No entanto, a bibliografía

científica dispoñible ata o momento permite describir este proceso cunha boa aproximación (Sensoy, 2021; Ogobuiro *et al.,* 2023).

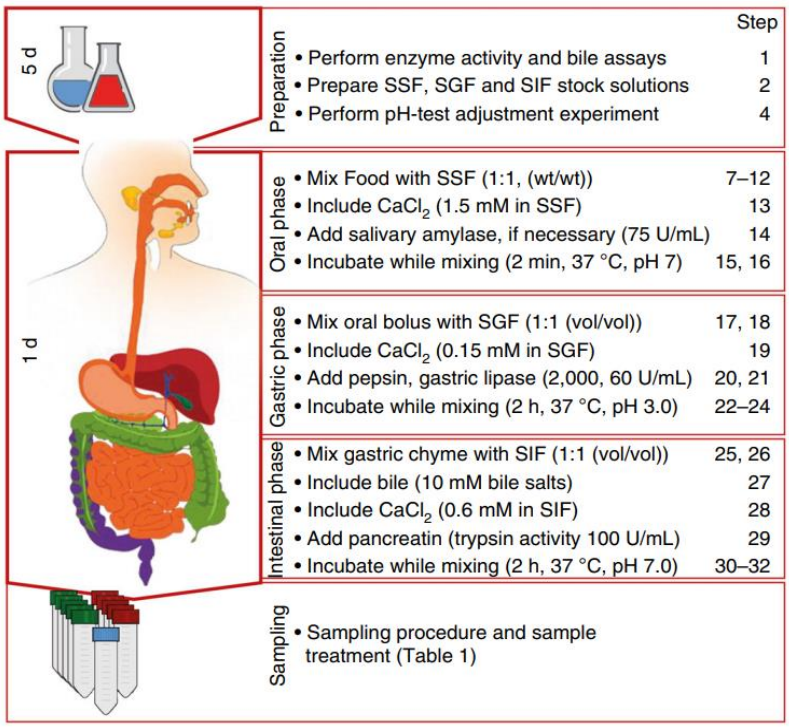

Figura 13. Diagrama de fluxo do método de dixestión segundo o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019)

En base a todo isto, levouse a cabo unha optimización dos parámetros de dixestión que se explicarán para cada unha das partes do GIDIS.

4.2.1. Optimización do proceso de mastigación e deglutición: a boca

O proceso dixestivo comeza co procesamento oral dos alimentos inxeridos. Como xa se comentou ata o momento, o alimento entra no GIDIS sendo introducido nunha trituradora, a cal simula o proceso de mastigación. Mentres, o alimento mestúrase co SSF, preparado conforme ao protocolo INFOGEST 2.0, isto é, con 75U/ml de α-amilasa cunha actividade específica de 100 U/mg, prequentado a 37ºC, considerada como a temperatura corporal media do corpo humano (Brodkorb *et al.*, 2019; Kong & Singh, 2008) e axustado a un pH de 7. Desta maneira, conséguese cortar, triturar e equilibrar termicamente conforme á temperatura corporal os alimentos, ao tempo que se mesturan coa saliva, tendo lugar unhas limitadas reaccións enzimáticas (a saliva contén unha pequena cantidade de amilasa salivar que realiza a hidrólise o amidón en glucosa), tal e como se indica na investigación de Boland (2016) que debe ocorrer na fase oral da dixestión. Ogobuiro *et al.* (2023) tamén indican que os procesos que deben ter lugar nesta cavidade son o procesamento mecánico dos

alimentos, é dicir, a mastigación, e a lubricación que se obtén ao mesturar os alimentos coa secreción das glándulas salivares, de maneira que se prepara para a formación dun bolo susceptible de ser deglutido, grazas a estes procesos, xunto co equilibrio térmico. Tamén se debe ter en conta o tempo durante o cal se introducen os alimentos, co fin de simular coa maior fiabilidade posible unha comida real. Na maioría das investigacións este tempo estímase de 20 minutos (Guerra *et al.*, 2016).

Na figura 14 obsérvanse os compoñentes da sección da boca.

En canto ao volume utilizado nas probas ou experimentos, tívose en conta, por un lado, o protocolo INFOGEST 2.0, que indica que en cada fase (oral, gástrica, intestinal), se debe diluír 1:1 o contido que provén da fase anterior co líquido simulador correspondente en cada caso (Brodkorb *et al.*, 2019) e, por outro lado, a capacidade máxima das membranas que forman o espazo utilizable do estómago, que é de 100 ml. Deste xeito, nos experimentos continuos cuxa intención era utilizar todo o simulador gastrointestinal, comezaban introducíndose 25 ml de alimento, que se diluían en 25 ml de SSF.

Figura 14. Fotografía da sección da boca do GIDIS (elaboración propia)

Según Boland (2016), o tempo de residencia na cavidade oral depende do/s alimento/s inxeridos, pero é xeralmente curto (entre 10 e 100 segundos). Tamén no protocolo INFOGEST 2.0 se indica un tempo curto, de arredor de 2 minutos (Brodkorb *et al.*, 2019). Durante as probas realizadas utilizando o GIDIS, concluíuse que este tempo dependerá da natureza do alimento, a súa textura, dureza, composición, etc., polo que para cada tipo de alimento/composto será variable e optimizarase en función da natureza/composto a testar.

Na dixestión dun líquido, a máis sinxela, no paso pola boca, o contacto do alimento coa saliva é mínimo (Guerra *et al.*, 2016). De feito, nos simuladores gastrointestinais que non integran o proceso oral na simulación, como o SIMGI, o alimento introdúcese directamente ao estómago (Cueva *et al.*, 2019). Ademais, tendo en conta a composición do alimento líquido a introducir, esta opción tórnase viable debido a que o SSF creado segundo Brodkorb *et al.*, (2019), no caso das enzimas, só contén α-amilasa, polo que un alimento líquido que non conteña hidratos de carbono, aínda que sufrira o proceso de dixestión oral, só sería deglutido

cara o estómago, sen sufrir ningún cambio fisico-químico na súa composición. Só neste caso, a introdución do alimento directamente no estómago obtería o mesmo resultado que a introdución a través da boca. No GIDIS, isto púxose en práctica cun acendido da bomba de transferencia da boca ao estómago simultaneamente coa adición na trituradora do alimento líquido, e cunha axitación mínima que permite a mestura do alimento co SSF. Deste xeito conséguese que o alimento pase, cun mínimo contacto co SSF, e se transfira ao estómago case inmediatamente, da mesma maneira que ocorre *in vivo* cando se deglute un alimento líquido.

Non obstante, os alimentos sólidos sempre deben pasar a través da trituradora para a súa transformación mecánica e a súa lubricación, e será necesaria unha optimización previa personalizada para cada alimento segundo a súa composición, textura, etc., para determinar o tempo necesario de "mastigación" no cal se consegue obter un bolo alimenticio dunha textura adecuada para a súa deglutición cara o estómago.

Para levar a cabo unha proba de mastigación, primeiramente, a trituradora debe atoparse acendida (na posición I). Seguidamente, no apartado de "control dixestivo", debe poñerse en marcha a trituradora. Para isto, no apartado de mastigación, debe accionarse a bomba, que ten tres modos: OFF, MANUAL e AUTO MASTIGACIÓN. En modo manual, tritúrase o alimento a unha velocidade constante, que non pode configurarse, mentres que en modo automático (AUTO MASTIGACIÓN), o alimento tritúrase a unha velocidade constante en intervalos, que si poden modificarse no apartado de configuración do sistema informático do GIDIS. A continuación, despois do tempo que se crea conveniente, producirase a deglutición do bolo alimenticio que, *in vivo*, consiste en transportalo ata o estómago grazas ao peristaltismo do esófago. No GIDIS, isto traduciuse en accionar a bomba de transferencia que se ocupa de pasar o contigo dende a boca ata o estómago. Así, a sonda realiza a función de esófago, e a bomba que se ocupa de transferir o contido crea o "peristaltismo" responsable do transporte. A maioría das bombas teñen a opción de traballar de forma manual ou automática, isto é, de xeito manual, a bomba acéndese e apágase por mandato da persoa operadora e, durante o tempo no que está acendida, funciona continuamente. Por outro lado, de xeito automático, a bomba funciona en intervalos, que poden axustarse na configuración do software segundo o desexado. Nesta bomba pode marcarse un fluxo en ml/min, dependendo do volume contido na cavidade oral. Con 25 ml de alimento (50 ml totais, sumando 25 ml de SSF), marcouse un fluxo de 50 ml/min, para deglutir o contido nun minuto.

Tamén existe a posibilidade de regular o pH na cavidade oral, a través dunha bomba que introduce o fluído contido nun recipiente. Unha vez máis, a bomba pode traballar de xeito manual ou automático, funcionando continuamente á velocidade marcada en revolucións por minuto na primeira opción, e funcionando en intervalos configurábeis no sistema informático

na segunda opción. O protocolo INFOGEST 2.0 indica que o pH da cavidade oral debe axustarse a un valor de 7 (Brodkorb *et al.*, 2019), mentres que noutras investigacións e libros se indica que o pH da saliva se achega á neutralidade, o que avala tamén o valor de 7 (Alegría *et al.*, 2015).

4.2.2. Optimización do proceso de dixestión gástrica: o estómago

O bolo alimenticio, unha vez deglutido, chega ao estómago, onde pode almacenarse temporalmente e/ou descompoñerse mecánica e quimicamente por acción dos ácidos e das enzimas estomacais (Ogobuiro *et al.*, 2023). De feito, o estómago é o último órgano participante na dixestión que ten a capacidade de descompoñer as partículas do alimento mecanicamente (Boland, 2016). Este órgano está formado histoloxicamente por tres capas musculares, cuxa contracción e relaxación permite a descomposición mecánica do bolo alimenticio, así como a mestura e axitación deste cos xugos gástricos para a formación do quimo (Ogobuiro *et al.*, 2023).

Esta axitación conséguese no GIDIS debido a que o estómago está formado por unha membrana flexible que se atopa rodeada dunha camisa de vidro, entre as cales circula auga, cumprindo dúas funcións: proporcionar ao estómago a temperatura desexada e provocar o movemento peristáltico cando recircula. Primeiramente, é necesario ter o baño termostático cheo de auga. Este dispositivo quenta e mantén a auga á temperatura da consigna indicada no software, que neste caso son 37ºC, a que se indica como temperatura corporal media no protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019) e noutros estudos como o levado a cabo por Kong & Singh (2008), e sendo tamén a que se usa en outros simuladores gastrointestinais (Sensoy, 2021). O baño termostático tamén pode funcionar de maneira manual ou automática. Do mesmo xeito que as bombas, cando traballa de maneira manual, funciona continuamente dende que o operador o acende ata que o apaga. Sen embargo, de maneira automática, acéndese e quenta o contido ata acadar a temperatura de consigna, momento no cal comeza a acenderse e apagarse alternativamente co fin de manter a temperatura alcanzada. Esta auga é bombeada á camisa do estómago, que comeza a encherse por abaixo e baleirase por arriba, é dicir, recircula seguindo esta orde, cumprindo as dúas funcións indicadas anteriormente. Para facilitar a comprensión disto último descrito, pode observarse na figura 15 os compoñentes do estómago e o baño termostático.

Figura 15. Vista de sección estomacal no GIDIS (esquerda) e baño termostático (dereita) (elaboración propia)

A frecuencia de recirculación debe tamén configurarse no software, pois responde ao tempo entre a apertura e o cerre das válvulas que introducen auga procedente do baño termostático. Este parámetro configurouse en 10 segundos por similitude coa investigación de Cueva *et al.* (2019). Realizáronse varias probas, pois o baño termostático contén un marcador no que se pode regular a potencia. Por exemplo, co baño termostático situado nunha potencia de 3, o contido do estómago, atemperado pola auga dirixida á camisa do estómago, chegou a 40, 4ºC en 1 hora, momento no que o baño se apagou, comezando a auga a arrefriarse, pero moi lentamente. Desta maneira, non se acadaron os 37ºC no contido do estómago ata despois de 2 horas e 45 minutos, polo que esta potencia non resultou a adecuada para realizar os experimentos á temperatura indicada como temperatura media corporal. Despois de varias probas, concluíuse que a potencia óptima era a posición 1, pois o contido do estómago acadou os 37ºC aproximadamente 45 minutos despois da introdución, manténdose despois en temperaturas que se asemellan a esta.

En canto ao volume utilizado nos experimentos, e recordando que da boca proviñan 50 ml (25 ml de alimento e 25 ml de SSF), estes son diluídos en outros 50 ml de SGF, tal como indica o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019).

Cando o bolo alimenticio acada o estómago, atópase cun pH moi ácido, pois cando se inxiren os alimentos desencadéase, por parte das células da parede gástrica, a secreción de ácido clorhídrico (Boland, 2016). A regulación do pH no GIDIS realízase mediante o funcionamento dunha bomba que introduce ácido, concretamente ácido clorhídrico 1N, co fin de que o contido estomacal acade o pH marcado. A bomba pode funcionar de xeito manual, de maneira que funciona a una velocidade constante, indicada polo operador, en revolucións

por minuto (rpm), ou de xeito automático. Desta maneira, mide o pH ao que se atopa o contido mediante un eléctrodo de pH que se introduce na peza central do estómago. En función desta medición, e do preto que se atope do valor de pH marcado como consigna, é dicir, valor de pH que se debe acadar e manter, a bomba ascéndese e apágase alternativamente, cada 20 segundos (marcado na configuración), a diferentes rpm, ata conseguir acadar a consigna marcada. Resultou ser necesaria unha configuración automática, pois o funcionamento manual provoca unha baixada de pH moito maior da necesaria, aínda a unha velocidade de funcionamento mínima. Por tanto, realizáronse diferentes probas introducindo o contido a diferentes pHs, para simular a inxestión de alimentos con diferentes valores de pH, e configurando a bomba nun modo de funcionamento automático.

O protocolo INFOGEST 2.0 indica un valor de 3 para o pH estomacal, mentres que outras investigacións como a de Boland (2016), a de Cueva *et al.* (2019) e o primeiro protocolo INFOGEST publicado por Minekus *et al.* (2014) recollen un pH de 2. Debido a isto, e por similitude co estudo de Cueva *et al.* (2019), pois utiliza o simulador gastrointestinal SIMGI, que simula a fase estomacal cun dispositivo igual ao do GIDIS, adoptouse como parámetro a seguir un valor de pH 2 en condicións de xaxún no estómago. Ademais, coa chegada dos alimentos ao estómago, este pH xeralmente faise máis básico, dependendo sempre do pH que teñan os alimentos. Isto pode observarse nalgúns estudios nos que se mide o pH gástrico durante a dixestión, por exemplo a investigación de Guerra *et al*. (2016), no que o valor de pH medio variou entre 1,4 e 4,6. No GIDIS, o SGF introduciuse no estómago cun valor de pH de aproximadamente 2, e realizáronse probas introducindo auga destilada como simulador de alimento líquido cun pH de 6,75, correspondéndose este valor co pH promedio da leite de vaca. A partir deste momento, e durante a introdución de HCl que realizan as bombas de control de pH simulando a secreción de ácido clorhídrico por parte das células parietais do estómago, observouse a medición de pH no estómago por parte dun eléctrodo colocado na peza central mentres se incubaba e mesturaba o contido a 37ºC. Deste xeito, o pH comezou a oscilar entre valores de 2,20 e 10, logo entre 1,7 e 6,86… observándose así que os valores medidos polo eléctrodo de pH oscilan ampliamente, aínda que, canto máis tempo pasa, van aproximandose máis á consigna marcada.

En canto ás accións enzimáticas, no estómago segrégase pepsina, unha proteasa, e lipasa gástrica. Ademais, dependendo da velocidade de mestura e a síntese de ácido, a amilasa salivar pode seguir actuando (Boland, 2016). Para o funcionamento dun simulador gastrointestinal como o GIDIS, inclúense as enzimas estomacais no SGF, nas concentracións adecuadas para obter unha actividade enzimática de 2000 U/ml de pepsina e 60 U/ml de lipasa gástrica, segundo o protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019). Dende o primeiro momento de contacto das enzimas co bolo alimenticio que provén da cavidade oral, o

protocolo INFOGEST 2.0 indica que deben incubarse xuntos durante 2 horas a unha temperatura de 37ºC. Porén, débese ter en conta as características especiais de cada alimento/composto a testar, e existen investigacións nas que se indica que os alimentos líquidos non se almacenan tanto tempo no estómago, senón que o seu baleirado gástrico comeza antes, como indican Guerra *et al.*, (2016), que estableceron un protocolo para a dixestión de alimentos líquidos, cuxo tránsito é máis rápido a través do aparato dixestivo ca o dos alimentos sólidos, porque os líquidos non experimentan unha fase de retardo no estómago, mentres que os sólidos experimentan unha fase de retardo de 30 minutos. Por exemplo, na experimentación de Worsøe *et al.* (2011) acadáronse como resultados os seguintes datos: a mediana do tempo de tránsito gástrico foi de 35,5 minutos, mentres que a mediana do tempo de tránsito no intestino delgado foi de 260,5 minutos.

Na peza central do estómago, ademais de atoparse o porto dende o que se pode medir o pH a través do eléctrodo de pH, áchanse outros tres portos con tres bombas, cuxas funcións son introducir o HCl para a regulación de pH, así como o SGF e outros elementos necesarios como, por exemplo, o alimento cando non é necesario simular a fase oral do proceso dixestivo.

A través do píloro, prodúcese o baleirado gástrico, aspecto da dixestión humana que non está ben dilucidado ata o momento. Xa no ano 1982, Elashoff *et al.* publicaron unha investigación na que observou a non linearidade do baleirado gástrico, propoñendo unha fórmula matemática para predicilo, utilizada nalgunhas investigacións con simuladores gastrointestinais dinámicos *in vitro* (Kong & Singh, 2008; Cueva *et al.*, 2019) Xa máis recentemente, grazas ao avance en técnicas de observación como a resonancia magnética, a ultrasonografía ou probas de alento, observáronse datos *in vivo* respecto ao tempo de baleirado gástrico con diferentes alimentos. Por exemplo, Hellmig *et al.* (2006) realizaron a proba de alento con isótopos marcados con carbono 13 a 90 individuos sans con comidas líquidas e sólidas, obtendo como resultado un t½ (tempo no que se baleira o 50% do quimo) de 80,5 ± 22,1 minutos para os líquidos e 143,6 ± 54,6 para os sólidos. Debido á incerteza que aínda circunda este concepto, e á influenza de múltiples factores no tempo de baleirado gástrico, como o volume de alimento, a densidade de enerxía, a temperatura, o pH, a composición, a textura, etc. (Leiper, 2015) adoptáronse para a optimización do GIDIS os datos anteriormente mencionados, realizándose probas co mínimo tempo de baleirado gástrico dado para os líquidos (t½ de 58,4, é dicir, un tempo de baleirado gástrico completo de aproximadamente 120 minutos).

4.2.3. O proceso de dixestión e absorción intestinal: o Intestino delgado

Despois do baleirado gástrico, o proceso da dixestión prosegue no intestino delgado, que se divide en tres rexións: o duodeno, o xexuno e o íleo. No primeiro tramo, o bolo alimenticio pasa dun pH ácido, pois provén do estómago, a un pH neutro, e acolle as enzimas hidrolíticas segregadas polo páncreas, coñecidas colectivamente como pancreatina, que comezan a actuar sobre os nutrientes que compoñen os alimentos inxeridos (Boland, 2016). O páncreas segrega tamén bicarbonato, que eleva o pH ata a neutralidade para fomentar a actividade das enzimas. Ademáis, segréganse os ácidos biliares, cuxa función consta de emulsionar as graxas, co fin de que a lipasa pancreática actúe con maior eficacia (Boland, 2016).

As dúas seguintes seccións do intestino delgado teñen como funcións principais permitir que as enzimas pancreáticas leven a cabo a súa acción e permitir a absorción dos aminoácidos, oligopéptidos, monosacáridos, disacáridos… nos que se converten os nutrientes máis complexos, pois o intestino delgado ten unha superficie e, polo tanto, unha área de absorción de aproximadamente 30 m^2 (Boland, 2016), grazas a que a mucosa do intestino delgado está formada por vilosidades, que a súa vez se compoñen de microvilosidades que permiten aumentar en gran medida a superficie de absorción (Ogobuiro *et al.*, 2023). Unha vez hidrolizados, estes fragmentos dixeribles deben difundirse dende o lugar de hidrólise ao lugar de absorción, proceso que compite coa velocidade de tránsito a través do intestino delgado. O que non se absorba, chegará ao colon e será consumido pola microbiota colónica. Nas tres partes do intestino delgado o movemento peristáltico ten moita importancia, tanto como función de mestura como de transporte (Boland, 2016).

O primeiro que debe destacarse do simulador gastrointestinal GIDIS é que non discirne as tres partes do intestino delgado que se acaban de describir, senón que se compón dun só reactor. Neste reactor recíbese o contido estomacal e tamén o SIF, que leva consigo as enzimas pancreáticas, nunha concentración adecuada para obter unha actividade enzimática de 100 U/ml de tripsina se se utiliza a pancreatina, nome que recibe o conxunto das enzimas pancreáticas. Outra opción é utilizar as enzimas pancreáticas por separado:

- Uso de pancreatina: nunha cantidade na que a tripsina alcance unha actividade de 100 U/ml na mestura final. Hai que ter en conta que se hai alimentos ricos en graxa ou se a dixestión da graxa é o obxectivo, pode non ser suficiente. Neste caso, pódese incluír lipasa adicional para obter 2.000 U/mL de actividade de lipasa na mestura final e colipasa nunha proporción molar de 2:1 (colipasa a lipasa)..

- Uso de enzimas individuais: deben utilizarse tripsina porcina (100 U/ml), quimotripsina bovina (25 U/ml), alfa-amilasa pancreática porcina (200 U/ml), lipasa pancreática porcina (2000 U/ml) e colipasa pancreática porcina en exceso molar respecto á lipasa (proporción de 2:1 colipasa:lipasa).

No SIF tamén se inclúen as sales biliares, nunha concentración de 10 mM, e introdúcese prequentado a 37ºC e axustado a un pH de 7, tal e como se indica no protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019). Ademais, cabe comentar que o SIF, coas enzimas pancreáticas, introdúcese nos primeiros minutos de residencia do contido no intestino delgado, co fin de salvar as diferenzas do intestino delgado *in vivo* co simulador e permitir que as enzimas pancreáticas entren en contacto co fluído proveniente do estómago no mesmo momento en que chega ao intestino delgado, e tamén que se achegue ao pH neutro. Deste xeito, durante o tempo de residencia restante no intestino delgado, mestúranse o quimo proveniente do estómago e o SIF grazas á simulación do peristaltismo, que se leva a cabo grazas a unha bomba peristáltica que fai recircular o contido dende o reactor, pasando por un intercambiador de calor que realiza a función de temperar o contido á temperatura indicada no sistema informático. A velocidade de recirculación indicada na bomba peristáltica é de 150 rpm, por similitude coa investigación de Cueva *et al.* (2019).

O volume usado no intestino delgado, recordando que do estómago proveñen 100 ml nos experimentos realizados no GIDIS, pois é case a súa capacidade máxima, é de 200 ml, para unha dilución 1:1, segundo se indica no protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019). Na figura 16 pode verse a sección do intestino delgado do GIDIS.

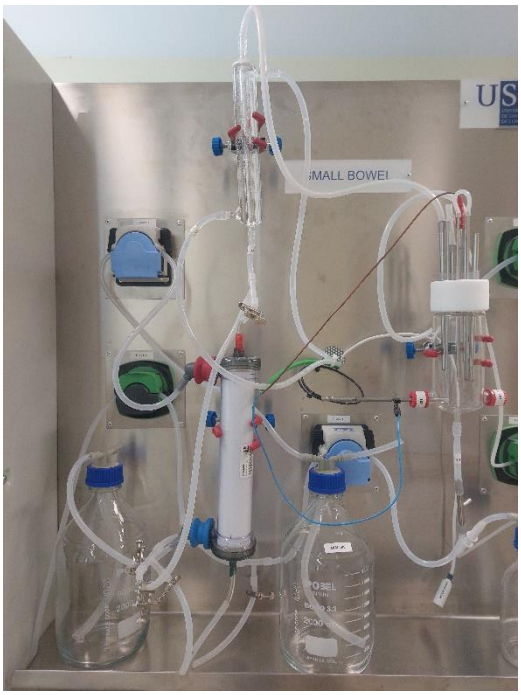

Figura 16. Vista da sección do intestino delgado do GIDIS (elaboración propia)

O reactor, ademais de conter os portos superior e inferior que permiten a recirculación do contido, contén o porto que permite a transferencia do estómago ao intestino delgado, á velocidade indicada segundo o tempo de baleirado gástrico determinado. Ademais, tamén contén outro porto que permite a regulación do pH, neste caso con NaOH, para convertelo nun pH máis básico, pois o quimo abandona o estómago cun pH aproximado de 2, como xa se comentou, e no intestino delgado debe achegarse ao pH neutro, de aproximadamente 7, tal e como se indica no protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019), ou na investigación de Cueva *et al.* (2019),

na que o pH intestinal se asemellou a un valor de 6,8. A regulación do pH realízase da mesma maneira ca no estómago, cunha bomba conectada a un recipiente que contén NaOH 1N. Do mesmo xeito, pode funcionar de maneira manual ou automática, sendo a automática a escollida porque permite, segundo as medicións do eléctrodo de pH, que a bomba se accione cando é necesaria a regulación do pH. Debido ao poder de tornar o pH en básico do NaOH, as primeiras probas realizáronse con NaOH diluído, a unha concentración de 0,275M. Non obstante, observouse que, ao introducirse maior volume de líquido, provocábase unha dilución da mostra non desexada, co inconveniente de que podía chegar a sobrepasarse o volume permitido no reactor e abortarse as accións en curso, pois, como sistema de seguridade, todos os reactores contan cun sensor de nivel que aborta as actividades cando detecta que pode sobrepasar o volume que é capaz de acoller.

As probas de regulación de pH realizadas no intestino delgado deron os seguintes resultados: co contido do estómago a un pH de 2 ± 0,5 e o SIF axustado a un pH de 7 ± 0,05, e introducindo ambos a 5 ml/min no reactor, nos primeiros minutos a medida de pH do reactor do intestino delgado foi de aproximadamente 2. Despois de 15 minutos o pH oscilaba entre 6 e 6,5 e aos 20 minutos entre 6,7 e 7,2, e a bomba accionábase en intervalos pequenos a pHs inferior a 6,8. Logo, trinta minutos despois do comezo da introdución de ambos, o pH estaba estable nun valor de 7 ± 0,1, manténdose así durante as 2 horas de residencia no intestino delgado.

No entanto, a regulación da temperatura non depende dun baño termostático, coma no estómago, senón que se realiza de xeito diferente. Neste caso, a auga provén dun depósito de auga, fría ou quente segundo se necesite. A regulación de temperatura do intestino delgado pode realizarse de xeito manual, isto é, controlando no sistema informático a apertura manual das válvulas tanto de auga fría como de auga quente, do xeito que se considere necesario, ou de maneira automática. Deste último modo, a apertura da válvula que permite bombear auga quente ou auga fría responde á medición da temperatura que se realiza no contido do reactor, e que se marca a 37ºC por razóns comentadas anteriormente. Así, conséguese regular e manter a temperatura mediante a introdución de auga quente ou fría segundo sexa necesario. Esta auga introdúcese no intercambiador de calor e, o contido, ao atravesar o intercambiador de calor mentres realiza o peristaltismo, atempérase á temperatura desexada. Debido á presenza no acumulador dun marcador con diferentes valores de potencia, realizáronse varias probas para comprobar cal era a potencia óptima para regular a temperatura. Desta maneira, observouse que, co marcador situado nunha potencia de 4, a temperatura do contido do intestino delgado, debido ao seu paso a través do intercambiador de calor, acadou os 38ºC, para logo diminuír e variar dentro dun intervalo de

37 ± 0,2 ºC, polo que se considerou como a potencia óptima para regular a temperatura no intestino delgado.

O tempo de residencia do quimo no intestino delgado é importante para a absorción dos nutrientes, tarefa principal das dúas últimas porcións do intestino delgado, pois o 90% da absorción dos nutrientes prodúcese aquí (Ogobuiro *et al.*, 2023). No GIDIS, este proceso pode simularse a través dunha membrana de diálise, que permite cribar os nutrientes, sobre os que xa actuaron as enzimas da cavidade oral, o estómago e o intestino delgado. Débese facer pasar o contido do intestino delgado pola membrana, o que é posible grazas a unha bomba peristáltica que permite que circule a través da membrana, diferente da bomba peristáltica que realiza a recirculación do contido. A diferenza de outras bombas e dispositivos que conforman o GIDIS, esta só pode utilizarse de maneira manual, co fin de que a absorción sexa un proceso controlado e se atope sempre baixo a supervisión dun investigador ou técnico de laboratorio.

Por estas cuestións, é importante determinar o tempo de residencia necesario para que o contido do intestino delgado sexa adecuadamente procesado, é dicir, que as enzimas pancreáticas actúen sobre todos os nutrientes susceptibles de ser descompostos. En investigacións como o primeiro protocolo INFOGEST, considérase que o tránsito a través do intestino delgado dura 3 horas (Minekus *et al.*, 2014). Porén, en investigacións máis recentes, por exemplo, no protocolo INFOGEST 2.0, considérase un período de residencia de 2 horas, que comezarían a contar cando todas as enzimas pancreáticas se atoparan en contacto co quimo (Brodkorb *et al.*, 2019), parámetro que adoptan na súa investigación de Cueva *et al.* (2019) e que, por tanto, se considera como o máis axeitado para a súa adopción na optimización do GIDIS.

Co paso das 2 horas de residencia no intestino delgado, a transferencia ao intestino groso dos 200 ml contidos no intestino delgado realizouse a unha velocidade de 5 ml/min, e activouse simultaneamente o tránsito en todos os reactores do colon á mesma velocidade, por similitude coa investigación de Cueva *et al.* (2019). O quimo proveniente do estómago mesturado co SIF, e desprovisto dos nutrientes que foron absorbidos no intestino delgado recibe o nome de quilo, e pasa ao colon a través da unión ileocecal ou válvula ileocecal, que está normalmente cerrada para evitar a regurxitación de contido do colon cara o íleo (Boland, 2016). Desta maneira, o quilo pasa a un ambiente anaerobio e atópase coa microbiota colónica, formada por unha ampla cantidade de bacterias, da orde de 10^{13}, e que pertencen a máis de 1000 especies diferentes, aínda que a composición da microbiota varía moito dun individuo a outro (Boland, 2016).

4.2.4. O proceso de dixestión colónica

O colon, igual que o intestino delgado, divídese en tres tramos ou partes: ascendente, transverso e descendente. As bacterias que residen nas dúas primeiras seccións do colon fermentan os compoñentes dos alimentos non dixeridos no paso anterior, como a fibra, converténdoos en ácidos graxos de cadea corta e/ou en metano, segundo o alimento que sexa ou a composición bacteriana da microbiota. A medida que se transporta o quilo polo colon, pasan a descompoñerse as proteínas e absórbese a auga para ser recuperada polo organismo, polo que se compacta (Boland, 2016).

Neste caso, o simulador gastrointestinal GIDIS si que conta coa distinción das tres partes do colon. Son tres reactores que traballan da mesma maneira ca o intestino delgado, pois a recirculación que simula o peristaltismo e favorece o transporte realízase do mesmo xeito, grazas á bomba peristáltica. A temperatura mídese dentro do contido, nun porto do reactor, estímase 37ºC e a regulación realízase da mesma maneira, coa apertura e cerre de válvulas en función da temperatura precisada e o intercambiador de calor, e cun resultado moi similar mantendo o marcador de potencia nun valor de 4. Tamén do mesmo xeito, a velocidade de recirculación indicada na bomba peristáltica é de 150 rpm, por similitude coa investigación de Cueva *et al.* (2019). Na figura 17 pódense observar as tres seccións que simulan, cada unha, unha parte do colon.

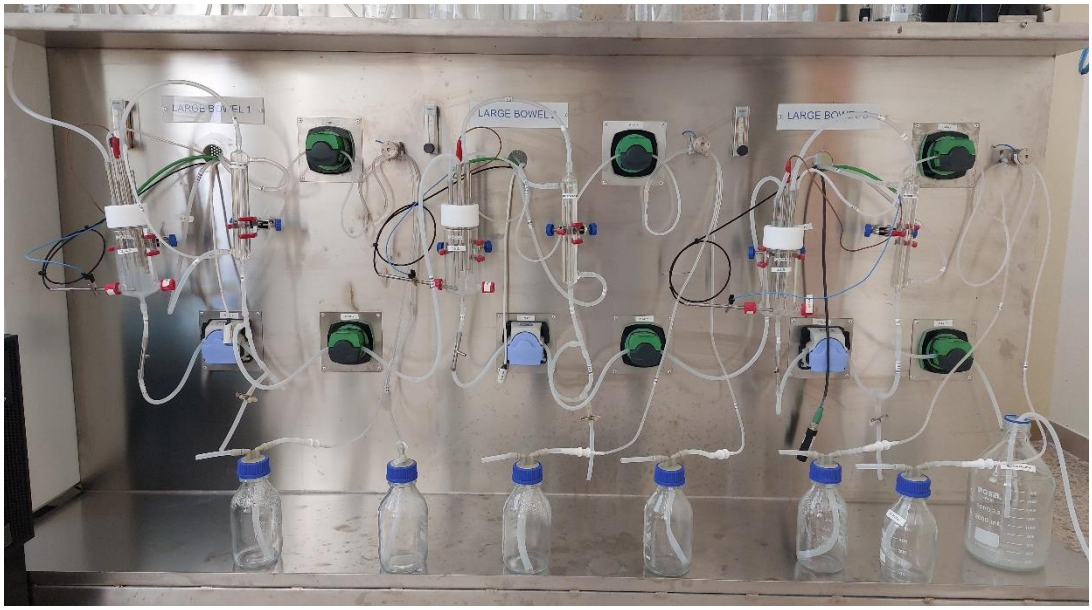

Figura 17. Vista das tres seccións que compoñen o intestino groso (elaboración propia)

Con todo, existen diferencias co intestino delgado, comezando pola regulación do pH. Neste caso, é máis sofisticada, pois existe a posibilidade de dispoñer de dúas solucións, unha con HCl e outra con NaOH, e bombear dunha ou doutra en función da necesidade, xa que dependendo do metabolismo bacteriano, os metabolitos xerados poderán subir ou baixar o

pH. O pH mídese no interior do reactor cun eléctrodo de pH e, como se comentou noutras ocasións, esta bomba de transferencia de pH tamén pode traballar en modo manual ou en modo automático. En modo manual, por mandato do operador, pode escollerse a solución da cal se quere extraer líquido, e a velocidade á que se desexa que traballe. No entanto, en modo automático, e segundo a medición de pH que se realice e o valor de pH que se proporcione ao sistema informático como óptimo, a bomba de pH ten a capacidade de cambiar a solución da cal extrae solución, e de funcionar nos intervalos e na velocidade óptimos para realizar a regulación. Para isto, é necesario indicar no sistema informático que controla o funcionamento do GIDIS os valores de pH óptimos de cada parte do colon. Como exemplo, Molly *et al.* (1993) regularon o pH do colon ascendente en valores comprendidos entre 5,5 e 6, o transverso en valores comprendidos entre 6 e 6,4, e o descendente entre valores de 6,4 e 6,8. Outros estudos como o de Cardelle-Cobas *et al.* (2012) ou Lopez-Santamarina *et al.* (2022) utilizan un pH de 6,7 e 6,8, respectivamente, para o colon distal (descendente), argumentando que este é o pH do colon en situación de eubiose. Por outro lado, tanto na investigación de Barroso *et al.* (2015) como na de Gil-Sánchez *et al.* (2020), levadas a cabo utilizando o simulador gastrointestinal SIMGI, os valores de pH que se utilizaron foron 5,6 ± 0,2 para o colon ascendente, 6,3 ± 0,2 para o colon transverso e 6,8 ± 0,2 para o descendente. Isto foi adaptado no GIDIS a un pH de 6 tanto no colon ascendente como no colon transverso e 7 no descendente, pois o sistema informático non permite colocar decimais nos valores a regular.

Outra diferenza que se atopa co intestino delgado é, obviamente, a insuflación de nitróxeno dentro dos reactores do intestino groso, pois aquí búscase dar lugar a un ambiente anaerobio para o mantemento do ecosistema bacteriano en condicións fisiolóxicas, tal e como se atopa o intestino groso, segundo se indica na bibliografía consultada (Barroso *et al.*, 2015; Boland, 2016; Gil-Sánchez *et al.*, 2020). Débese realizar a apertura da vía de nitróxeno cara os tres reactores do intestino groso de maneira que o fluxo sexa continuo.

Realizáronse probas inoculando un medio nutritivo autoclavado en cada reactor, pois cando se requira a inoculación de mostras fecais para estudios relacionados coa microbiota, efectos prebióticos e probióticos dos alimentos, etc., necesítase a inoculación deste medio, que realiza a tarefa de alimentar e manter as bacterias presentes nas mostras fecais, e un período de estabilización. O medio nutritivo preparouse segundo Cardelle-Cobas *et al.* (2012), aínda que se concentrou 3 veces, debido a que nos reactores do GIDIS non é posíbel añadir 200 ml de medio pois, ao transferirse o contido do intestino delgado, sobrepasaríase o volume máximo dos reactores, que é de 500 ml, ademais de que non se contempla a posibilidade de renovar este medio nutritivo durante o experimento, a non ser manualmente por parte do operador, polo que será arrastrado pola transferencia entre as diferentes partes do intestino

groso. Entón, engadíronse 100 ml de medio concentrado en cada reactor. Cunha velocidade de fluxo de 5 ml/min entre os reactores e o peristaltismo creado polas bombas peristálticas a unha velocidade de 150 rpm, como se comentou anteriormente, o experimento finaliza cando todo o contido acaba o final do recorrido do GIDIS.

Como resultado, desenvolveuse unha metodoloxía de traballo que permitirá utilizar o GIDIS para a realización de incontábeis estudos, podendo ser aplicado principalmente como paso previo a estudos de intervención en humanos, en investigacións do ámbito nutricional, toxicolóxico, farmacéutico, microbiolóxico, etc. (Guerra *et al.*, 2012). Algunhas das aplicacións deste simulador pasan polo estudo da bioaccesibilidade de compostos activos ou ingredientes alimentarios (Tamargo *et al.*, 2017), a avaliación da supervivencia e da actividade de certos probióticos no TGI (Gil-Sánchez *et al.,* 2020), deseño de novos alimentos ou produtos para mellorar a saúde humana (Sensoy, 2021) ou a realización de probas de disolución e desintegración de fórmulas farmacéuticas (Alegría *et al.,* 2015). Ademais, débese ter en conta que as novidades incluídas neste simulador respecto a outros amplían as súas posibilidades de uso, por exemplo, respecto á simulación da absorción.

Na figura 18 pódese observar un esquema cunha vista xeral do GIDIS seguido dun resumo que recolle os parámetros que foron optimizados en cada sección:

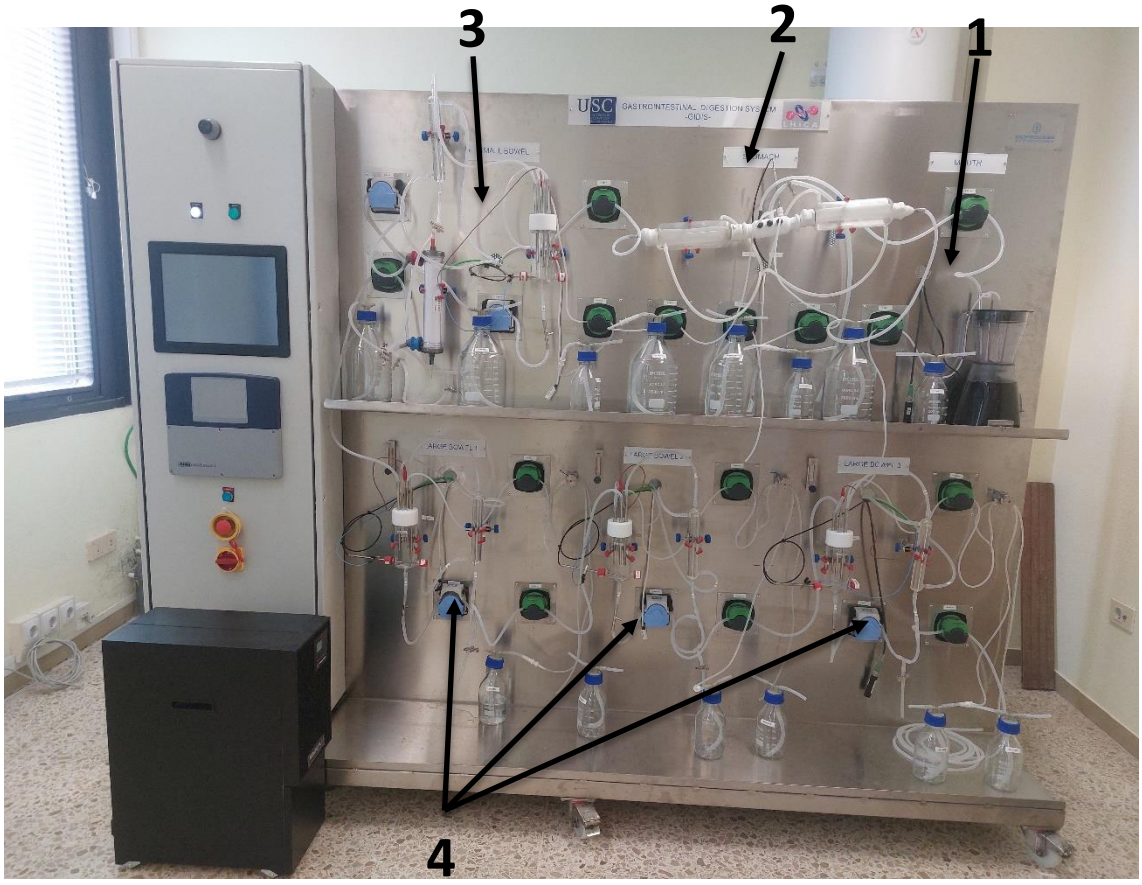

Figura 18. Esquema dos parámetros optimizados en cada rexión do GIDIS

1. Boca: pH= 7; Tª= 37ºC; tempo de residencia para alimentos sólidos = 2 min; tempo de residencia para alimentos líquidos = mínimo; volume de alimento = 25 ml; 25 ml de SSF; velocidade de fluxo cara o estómago = 50 ml/min

2. Estómago: frecuencia de recirculación = 10 segundos; potencia de baño termostático = 1; pH= 2; Tª= 37ºC; 50 ml de SGF; tempo de residencia= 2 horas; tempo de baleirado gástrico= 80,5 ± 22,1 minutos para os líquidos e 143,6 ± 54,6 para os sólidos.

3. Intestino delgado: velocidade de recirculación= 150 rpm; Tª= 37ºC; pH=7; 100 ml de SIF; potencia de quentador de auga= 4; tempo de residencia= 2 horas; velocidade de paso ao colon= 5 ml/min

4. Colon: potencia de quentador de auga= 4; Tª= 37ºC; velocidade de recirculación= 150 rpm; pH= 6 en colon ascendente e transverso; pH= 7 en colon descendente; 100 ml de medio nutritivo en cada reactor; fluxo de 5 ml/min entre os tres reactores; tempo de residencia ata final de experimento por eliminación do contido.

5. Conclusións

- Neste traballo desenvolveuse un modelo chamado GIDIS, un simulador gastrointestinal dinámico multi-compartimental que integra a simulación do proceso de dixestión dende a boca ata o ano, englobando como novidades, respecto aos sistemas gastrointestinais dinámicos xa existentes, a inclusión da mastigación no propio equipo, o peristaltismo do intestino delgado e groso creada por bombas peristálticas, que crean un movemento máis similar ao real (comparado con outros simuladores gastrointestinais) e a posibilidade de levar a cabo a absorción no intestino delgado grazas a unha membrana de diálise.

- A súa optimización levouse a cabo utilizando como guía a literatura científica máis relevante sobre a fisioloxía da dixestión e a posta a punto doutros simuladores gastrointestinais, e o protocolo INFOGEST 2.0. Os parámetros que se optimizaron foron a temperatura, o pH e os tempos de residencia en cada órgano do aparato dixestivo, así como o movemento peristáltico no estómago e no intestino delgado e groso, os fluídos dixestivos e as enzimas, a insuflación de nitróxeno, a velocidade de mastigación e a absorción de nutrientes.

En investigacións posteriores e por limitación de tempo no presente estudo deberá:

1. Comprobarse o sistema coa inoculación de mostras fecais humanas que simularán o ecosistema microbiano colónico
2. Realizarse a validación do equipo, para asegurar que aporta resultados coincidentes con datos *in vitro* doutros simuladores e *in vivo* e, por tanto, verdadeiros, que permitirán aumentar as posibilidades de utilización dos simuladores gastrointestinais e sacar conclusións co seu uso en estudos preclínicos, coa fin de optimizar previamente os parámetros, sempre buscando mellorar a saúde do hóspede.

6. Bibliografía

Alegría, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static Digestion Models: General Introduction. In K. Verhoeckx (Eds.) et. al., *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. (pp. 3–12). Springer.

Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., & Requena, T. (2015). Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic simulator of the gastrointestinal tract SIMGI. *LWT - Food Science and Technology, 61*(2), 283–289. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.014

Bellmann, S., Lelieveld, J., Gorissen, T., Minekus, M., & Havenaar, R. (2016). Development of an advanced *in vitro* model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology. *Food Research International, 88*, 191–198. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.030

Boland M. (2016). Human digestion--a processing perspective. *Journal of the science of food and agriculture, 96*(7), 2275–2283. https://doi.org/10.1002/jsfa.7601

Bondue, P., Lebrun, S., Taminiau, B., Everaert, N., LaPointe, G., Crèvecoeur, S., Daube, G., & Delcenserie, V. (2020). A toddler SHIME® model to study microbiota of young children. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(16). https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa135

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Collins, M., Kolida, S., & Rastall, R. A. (2012). *In vitro* fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(8), 2024–2032. https://doi.org/10.1021/jf203622d

Chen, J., Gaikwad, V., Holmes, M., Murray, B., Povey, M., Wang, Y., & Zhang, Y. (2011). Development of a simple model device for *in vitro* gastric digestion investigation. *Food & Function, 2*(3–4), 174. https://doi.org/10.1039/c0fo00159g

Cordonnier, C., Thévenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Alric, M., Livrelli, V., & Blanquet-Diot, S. (2015). Dynamic *in vitro* models of the human gastrointestinal tract as relevant tools to assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota. *Microorganisms, 3*(4), 725–745. https://doi.org/10.3390/microorganisms3040725

Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Tamargo, A., Miralles, B., Crespo, J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2019). Gastrointestinal digestion of food-use silver nanoparticles in the dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract (simgi®). Impact on human gut microbiota. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *132*, 110657. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110657

Directiva Europea 2010/63/UE, do Parlamento Europeo e do Consello, do 22 de setembro de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea, L276/33*, de 20 de octubre de 2010. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex:32010L0063

Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59*(10), 1546–1562. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900

Elashoff, J. D., Reedy, T. J., & Meyer, J. H. (1982). Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology*, *83*(6), 1306–1312.

Ferrua, M. J., & Singh, R. P. (2015). Human Gastric Simulator (Riddet Model). In K. Verhoeckx (Eds.) et. al., *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. (pp. 61–71). Springer.

García-Villalba, R., Vissenaekens, H., Pitart, J., Romo-Vaquero, M., Espín, J. C., Grootaert, C., Selma, M. V., Raes, K., Smagghe, G., Possemiers, S., Van Camp, J., & Tomas-Barberan, F. A. (2017). Gastrointestinal Simulation Model TWIN-SHIME Shows Differences between Human Urolithin-Metabotypes in Gut Microbiota Composition, Pomegranate Polyphenol Metabolism, and Transport along the Intestinal Tract. *Journal of agricultural and food chemistry, 65*(27), 5480–5493. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02049

Gil-Sánchez, I., Cueva, C., Tamargo, A., Quintela, J.C., de la Fuente, E., Walker, A.W., Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B. (2020). Application of the dynamic gastrointestinal simulator (simgi®) to assess the impact of probiotic supplementation in the metabolism of grape polyphenols. *Food research international*, *129.* https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108790

Guerra, A., Denis, S., le Goff, O., Sicardi, V., François, O., Yao, A. F., Garrait, G., Manzi, A. P., Beyssac, E., Alric, M., & Blanquet-Diot, S. (2016). Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnology and bioengineering, 113*(6), 1325–1335. https://doi.org/10.1002/bit.25890

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, *30*(11), 591–600. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001

Hellmig, S., Von Schöning, F., Gadow, C., Katsoulis, S., Hedderich, J., Fölsch, U. R., & Stüber, E. (2006). Gastric emptying time of fluids and solids in healthy subjects determined by 13C breath tests: influence of age, sex and body mass index. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *21*(12), 1832–1838. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04449.x

Hugenholtz, F., & de Vos, W. M. (2018). Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS, 75*(1), 149–160. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2693-8

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (sin data). *Nuestro equipo*. SIMGI. https://www.cial.uam-csic.es/simgi/equipo.html

Jung, S. M. & Kim, S. (2022). *In vitro* Models of the Small Intestine for Studying Intestinal Diseases. *Frontiers in microbiology*, 12, 767038. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.767038

Kheadr, E., Zihler, A., Dabour, N., Lacroix, C., Le Blay, G., & Fliss, I. (2010). Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic *in vitro* model. *Journal of applied microbiology*, *109*(1), 54–64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04644.x

Kong, F., & Singh, R. P. (2010). A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *Journal of Food Science, 75*(9). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x

Kong, F. & Singh, R.P. (2008). Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science, 73*: R67-R80. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x

Kozu, H., Nakata, Y., Nakajima, M., Neves, M. A., Uemura, K., Sato, S., Kobayashi, I., & Ichikawa, S. (2014). Development of a human gastric digestion simulator equipped with peristalsis function for the direct observation and analysis of the food digestion process. *Food Science and Technology Research, 20*(2), 225–233. https://doi.org/10.3136/fstr.20.225

Leiper J. B. (2015). Fate of ingested fluids: factors affecting gastric emptying and intestinal absorption of beverages in humans. *Nutrition reviews*, *73 Suppl 2*, 57–72. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv032

Lopez-Santamarina, A., Cardelle-Cobas, A., del Carmen Mondragon, A., Sinisterra-Loaiza, L., Miranda, J. M., & Cepeda, A. (2022). Evaluation of the potential prebiotic effect of Himanthalia elongata, an Atlantic brown seaweed, in an *in vitro* model of the human distal colon. *Food Research International*, *156*, 111156. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111156

Lunney J. K. (2007). Advances in swine biomedical model genomics. *International journal of biological sciences, 3*(3), 179–184. https://doi.org/10.7150/ijbs.3.179

Mandalari, G., Chessa, S., Bisignano, C., Chan, L., & Carughi, A. (2016). The effect of sun-dried raisins (Vitis vinifera L.) on the *in vitro* composition of the gut microbiota. *Food & function*, *7*(9), 4048–4060. https://doi.org/10.1039/c6fo01137c

Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., & Picque, D. (2014). Validation of a new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry, 145*, 1039–1045. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.036

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & function*, *5*(6), 1113–1124. https://doi.org/10.1039/c3fo60702j

Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Veld, J. H. I. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives to Laboratory Animals*, *23*(2), 197-209. https://doi.org/10.1177/026119299502300205

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

Objetivos y Metas de Desarrollo Sostenible - Desarrollo Sostenible (2015) *United Nations*. https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/

Ogobuiro, I., Gonzales, J., Shumway, K. R., & Tuma, F. (2023). Physiology, Gastrointestinal. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Ripken, D., & Hendriks, H. (2015). "Porcine *ex vivo* intestinal segment model," in *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models*. eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, and A. Mackie, et al. (Cham, CH: Springer), 255–262.

Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabrille, V., Miranda, J. M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota-a review. *Journal of physiology and biochemistry*, *74*(1), 69–83. https://doi.org/10.1007/s13105-017-0564-2

Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in *vitro models*. *Current Research in Food Science, 4*, 308-319. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004

Siegel, J. A., Urbain, J. L., Adler, L. P., Charkes, N. D., Maurer, A. H., Krevsky, B., Knight, L. C., Fisher, R. S., & Malmud, L. S. (1988). Biphasic nature of gastric emptying. *Gut, 29*(1), 85–89. https://doi.org/10.1136/gut.29.1.85

Tamargo, A., Gil-Sánchez, I., Miralles, B., Martín, D., Rodríguez García-Risco, M., Fornari, T., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Cuevas, C. (2017). Simulador gastrointestinal dinámico (simgi): una herramienta potencialmente útil en nutrición clínica. *Nutrición Hospitalaria, 34*, 1489-1496. https://dx.doi.org/10.20960/nh.1207

Thuenemann, E. C., Mandalari, G., Rich, G. T., & Faulks, R. M. (2015). Dynamic Gastric Model (DGM). In K. Verhoeckx (Eds.) et. al., *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. (pp. 47–59). Springer.

Van den Abbeele, P., Venema, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W., & Possemiers, S. (2013). Different human gut models reveal the distinct fermentation patterns of Arabinoxylan versus inulin. *Journal of agricultural and food chemistry, 61*(41), 9819–9827. https://doi.org/10.1021/jf4021784

Wang, J., Wu, P., Liu, M., Liao, Z., Wang, Y., Dong, Z., & Chen, X. D. (2019). An advanced near real dynamic *in vitro* human stomach system to study gastric digestion and emptying of beef stew and cooked rice. *Food & Function, 10*(5), 2914–2925. https://doi.org/10.1039/c8fo02586j

Wickham, M. J., Faulks, R. M., Mann, J., & Mandalari, G. (2012). The design, operation, and application of a dynamic gastric model. *Dissolution Technologies, 19*(3), 15–22. https://doi.org/10.14227/dt190312p15

World Health Organization. (16 de septiembre de 2022). *Enfermedades no transmisibles*. World Health Organization. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases

Worsøe, J., Fynne, L., Gregersen, T., Schlageter, V., Christensen, L. A., Dahlerup, J. F., Rijkhoff, N. J., Laurberg, S., & Krogh, K. (2011). Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system. *BMC gastroenterology*, *11*, 145. https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-145

Wu, Q., Chen, T., El-Nezami, H., & Savidge, T. (2020). Food Ingredients in Human Health: ecological and metabolic perspectives Implicating gut microbiota function. *Trends in Food Science and Technology*, *100*, 103-117. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.007