

Protocolos de digestibilidad para modelos gástricos *in vitro*

F. Donis-Rabanales^{1,2}, J. Montalvo-González^{1,2}, T. López-Ruiz^{1,2}, L. Ruiz-Huerta^{1,2}, A. Caballero-Ruiz^{1,2*}

¹ Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico City, Mexico

² National Laboratory for Additive and Digital Manufacturing MADiT, Mexico
*alberto.caballero@icat.unam.mx

Resumen

El estudio de la digestión a través de modelos *in vivo* implica una serie de recursos complejos, por lo que los modelos *in vitro* surgen como alternativa para el estudio de la digestión. Diversos modelos se han desarrollado con el objetivo de simular la digestión humana, pero a pesar de la variedad de modelos encontrados en la literatura, aún no existe un protocolo de digestión estándar que permita evaluar la digestión *in vitro* con respecto a la *in vivo*. En este trabajo se presenta una revisión de diversos modelos y protocolos de estudio de la digestibilidad gástrica reportados en la literatura. Así mismo, se presenta un modelo gástrico que adapta la anatomía del estómago distal para estudiar la desintegración física y química de los alimentos con el fin de desarrollar protocolos de digestibilidad gástrica. Para validar su funcionamiento, se evaluó la forma de onda de presión, encontrando que los gradientes de presión y la forma de onda son similares a los resultados reportados en estudios *in vivo*. Para validar la desintegración mecánica dentro del simulador se desarrolló un ensayo utilizando melón cortado en cubos con la adición de HCl 5M con pH 1.5. Finalmente, se realizó una prueba para validar el proceso de mezclado al interior del modelo utilizando una solución de goma guar (0.6% m/V) y adicionando azul de metileno al 0.5% como trazador. Con el desarrollo del sistema propuesto se demostró su capacidad para la implementación de protocolos de digestibilidad gástrica.

Palabras clave: Digestión, Modelo gástrico, Modelo *in vitro*, Protocolo de digestibilidad.

1. Introducción

La digestión *in vitro* se define como el método que intenta emular el proceso digestivo de los seres humanos. Es el más popular y rentable para determinar la bioaccesibilidad, ya que prueba principalmente los cambios en la propiedades físicoquímicas de un sistema de entrega cuando este es expuesto secuencialmente a una serie de fluidos artificiales que simulan las condiciones de la boca, el estómago, el intestino delgado y el colón [1, 2].

En la actualidad, los modelos de digestión *in vitro* se clasifican en modelos estáticos y modelos dinámicos. Estos estudios *in vitro* al ser desarrollados fuera del organismo, a diferencia de los estudios *in vivo*, ahorran tiempo, trabajo, reducen costos, y no presentan restricciones éticas que a menudo limitan la experimentación en humanos [3].

Dentro de los antecedentes necesarios para comprender el funcionamiento de un modelo de digestión *in vitro* se identifican: el proceso de digestión, la anatomía y fisiología gástrica, motilidad gástrica, fuerzas de presión y de corte, vaciamiento gástrico y secreción. Los modelos de digestión *in vitro* pueden presentar variaciones principalmente en el número y tipo de fase de estudio (oral,

gástrica, intestinal), soluciones digestivas y tasas de secreción utilizados en cada una de estas fases, la magnitud y dirección de los esfuerzos mecánicos, y geometrías [4].

A pesar de la diversidad de modelos *in vitro* reportados en la literatura, que imitan la anatomía y fisiología del sistema digestivo, no existe un protocolo de digestibilidad estándar para los modelos dinámicos. En este trabajo se presenta una revisión de los modelos gástricos *in vitro* más relevantes (principalmente de tipo dinámico) y de los protocolos de digestibilidad reportados. Así mismo, se presenta un modelo gástrico y sus primeras pruebas para demostrar el grado de procesamiento físico y químico que proporciona y su potencial para el desarrollo de protocolos de digestibilidad.

2. Metodología

Para establecer los requerimientos del simulador *in vitro* del sistema gástrico propuesto, se analizaron algunos de los diferentes modelos y protocolos de digestibilidad reportados hasta el momento.

2.1 Modelos *in vitro* del sistema digestivo

Los modelos estáticos son las técnicas más sencillas y tienen un objetivo de estudio particular, no imitan los procesos físicos y fisiológicos que se producen *in vivo*, como las contracciones peristálticas, la frecuencia de estas contracciones, las presiones ejercidas por las paredes gástricas, la tasa de vaciado, entre otros [5, 6]. La estructura básica de los métodos estáticos se conforma por la muestra de estudio, un contenedor (generalmente un vaso de precipitado), un medio de disolución, un ambiente controlado a temperatura de 37°C y un agitador que estimula la disolución de la muestra mediante una agitación constante durante un tiempo entre 1-3 horas. Estos modelos se han utilizado principalmente para la disolución de fármacos [5].

Los modelos dinámicos han adquirido una gran importancia en la industria farmacéutica y en la investigación de alimentos por la capacidad de imitar las condiciones complejas del lumen gástrico. A principios de la década de 1990 se desarrolló el modelo TNO Gastrointestinal TIM-1 con el objetivo de predecir la bioaccesibilidad de comidas y productos farmacéuticos y evaluar el tiempo de tránsito de la comida a través del tracto gastrointestinal. Este modelo multicompartmental engloba la parte gástrica y las tres regiones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) siendo el primero en adaptar y controlar los parámetros dinámicos del lumen gástrico e intestinal [7]. Posteriormente se desarrolló el modelo TIM-agc (advanced gastric compartment) para incluir la motilidad gástrica [8].

Recientes modelos se han enfocado en replicar la anatomía del estómago, así como su proceso fisiológico. El sistema gástrico mecánico *in vitro* (IMGS, por sus siglas en inglés) se desarrolló para evaluar la lipólisis intestinal de emulsiones de aceite en agua (O/W) estabilizadas con proteína, el modelo está compuesto de un estómago fabricado en látex donde las contracciones son realizadas por un conjunto de pistones y adapta los cambios de pH así como la frecuencia de contracciones [9]. Por otra parte, “el estómago humano *in vitro* accionado por cuerda” (RD-IV-HSM, por sus siglas en inglés) fue utilizado para estudiar la liberación de nutrientes y la bioaccesibilidad, y los efectos del procesamiento bioquímico y físico de alimentos y medicamentos; dicho modelo se fabricó con silicona y las contracciones se realizan por un sistema de cuerdas y es capaz de reproducir la secreción dinámica de enzimas gástricas, así como el vaciado gástrico [10]. El modelo de simulación gástrica (GSM, por sus siglas en inglés) es un modelo gástrico hecho de látex que incorpora la geometría del estómago humano; las contracciones son producidas por un conjunto de jeringas accionadas neumáticamente que emulan la secreción gástrica y las fuerzas de contracción en el tránsito y digestión de los alimentos en el estómago [11].

2.2 Protocolos de digestibilidad

Durante la revisión de la literatura se identificaron las tres fases que componen el proceso de digestión *in vitro*: oral, gástrica e intestinal. Se observó que, dependiendo del tipo de estudio, los protocolos de digestibilidad presentan variaciones en la duración y número de fases incluidas en la secuencia de digestión, la preparación y composición de los fluidos digestivos simulados en cada una de las fases, la porción y estructura del alimento, la recolección, tratamiento y análisis subsecuente del contenido resultante del proceso digestivo *in vitro*.

Uno de los protocolos de digestibilidad más relevantes identificados es el protocolo INFOGEST 2.0, desarrollado en 2014 por la red COST INFOGEST, es un método estandarizado de digestión estática que utiliza proporciones constantes de comida a fluidos digestivos y pH constantes para cada paso de la digestión, proporciona el marco de tiempo esperado, las etapas y los números de pasos del procedimiento, permite analizar los productos resultantes de la digestión de los alimentos, así como evaluar la liberación de micronutrientes de la matriz alimentaria. Lucas *et al.* (2018) mencionan que la comunidad científica ha mostrado gran interés en este estudio, desde su publicación en 2014, con 345 citaciones [4, 12].

El modelo gastrointestinal TIM-1 [7], incluyó las tres fases de la digestión para su evaluación. Para la fase oral, la comida se mezcló con saliva artificial en un procesador de alimentos para simular la masticación. La secreción gástrica utilizada se compuso de electrolitos, pepsina y una lipasa fúngica, mientras que la secreción duodenal, de electrolitos, bilis y pancreatina. El pH se reguló por medio de válvulas controladas a través de software, secretando agua o HCl 1 M hacia el estómago, y agua o NaHCO₃ 1M hacia el duodeno, los productos de digestión solubles en agua fueron eliminados por diálisis, a través de membranas conectadas al compartimento del yeyuno e ileon, y los productos lipofílicos a través de un filtro o membrana de poros de 50 nm.

El GSM [11] incluyó en su evaluación a las fases oral y gástrica, para la fase oral se utilizó salchicha hecha con pollo y puerco, la cual fue transformada en cubos de 5.0 mm para simular el efecto de la masticación. Previo a las pruebas de la fase gástrica *in vitro* las enzimas fueron agregadas, y para simular la fase cefálica de la secreción gástrica se añadieron 20 mL de jugo gástrico simulado. La secreción extra de jugo gástrico simulado y el vaciado se iniciaron justo después de cargar la mezcla, a tasas de flujo de 2 ml/min y 3 ml/min, respectivamente. La última etapa del protocolo de digestibilidad utilizado en el GSM fue el muestreo, las muestras recolectadas fueron colocadas en un baño de hielo hasta su análisis.

El Simulador de Digestión Gástrica de tipo continuo (c-GDS, por sus siglas en inglés), desarrollado por Kozu et al. en 2017, fue equipado con secreción continua de jugo gástrico simulado y vaciado de contenido. Para la evaluación cuantitativa de la mezcla dentro del c-GDS únicamente se incluyó la fase gástrica. En el protocolo de digestibilidad se utilizó azul de metileno como trazador en los alimentos líquidos modelo (soluciones de almidón a diferentes concentraciones disueltas en agua ultra pura), estos fueron inyectados dentro del recipiente del c-GDS (100 ml), y durante el tiempo del experimento del c-GDS (180 min) se midió la concentración de azul de metileno dentro del recipiente, su concentración inicial fue de 10 mg/L. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura constante de 37°C. Agua ultra pura sin azul de metileno fue continuamente suministrada, a una tasa de flujo de 1 ml/min, dentro del recipiente del c-GDS para simular la secreción gástrica. El contenido del recipiente del c-GDS fue vaciado cada 15 min, y la concentración del azul de metileno en cada fracción recolectada fue medida con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm [13].

El IMGS [9], desarrollado en 2016, incluyó las fases gástrica e intestinal, y fue evaluado a través de un protocolo de digestibilidad de lípidos. El protocolo se llevó a cabo bajo dos metodologías: (1) metodología "IMGS-SBi" donde la digestión gástrica se realizó en el IMGS, y la digestión intestinal

en un vaso de precipitados de vidrio bajo agitación continua (SBI) a ~150 rpm, y (2) metodología “SBg-SBI” donde se utilizó un vaso de precipitados de vidrio bajo agitación continua en los dos ensayos de digestión: gástrica e intestinal. En ambas metodologías, los tiempos de digestión gástrica e intestinal fueron 90 y 120 min, respectivamente. Para la digestión intestinal, se agregaron 750 ml del contenido de la digestión gástrica dentro del SBI, ahí fueron incubadas y ajustadas a pH 7.0. Posteriormente se añadieron 750 ml de fluido intestinal simulado (FIS) bajo agitación continua y el contenido gástrico fue ajustado de nuevo a pH 7.0. Inmediatamente después, el pH fue mantenido a 7.0, titulando los ácidos libres grasos hidrolizados en intervalos de 5 s por 120 min para su análisis.

2.3 Propuesta de modelo *in vitro* del estómago

Se han desarrollado diversos modelos con el objetivo de emular el proceso fisiológico de la digestión gástrica e intestinal, cada uno de ellos con una configuración diferente y una forma única de llevar a cabo las contracciones peristálticas. Es importante mencionar que la digestión llevada a cabo en cada uno de ellos contempla diversas dietas, así como diversas concentraciones de las soluciones que simulan el jugo gástrico o la saliva y que son vertidos en diferentes tasas de dosificación. La variedad de protocolos gástricos que existe obedece a que no existe un protocolo estándar que indique los parámetros a nivel digestivo para ensayos en diferentes campos como la industrias de alimentos, la nutrición o la farmacología. Como propuesta para evaluar y desarrollar protocolos de digestibilidad puedan resultar en un estándar para protocolos digestión se propone, como primera aproximación, el desarrollo de un modelo *in vitro* del estómago. Debido a que en el estómago distal es donde se lleva a cabo la descomposición física y química de los alimentos como consecuencia de las ondas de contracción antral (ACW's, por sus siglas en inglés), el modelo propuesto sólo reproduce esa sección.

Los requerimientos considerados para el desarrollo del modelo fueron emular las condiciones de la digestión gástrica como son la frecuencia de contracciones peristálticas, los niveles de presión, los cambios de pH y la temperatura corporal; así como que tuviera una geometría anatómicamente similar al estómago humano de un adulto promedio. Como especificaciones se consideró que el simulador debía proporcionar presiones máximas de hasta 30 mmHg que son la presentes en la parte distal del estómago humano; soportar cambios dinámicos de acidez entre un pH de 1.5 y 7; generar una frecuencia de 3 contracciones por minuto; y mantener una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El modelo desarrollado fue denominado “Simulador gástrico distal *in vitro*” (IV-DGS, por sus siglas en inglés).

En la Fig. 1 se muestra una imagen del IV-DGS; como puede observarse, el modelo está conformado por dos cámaras que simulan la región antral y el píloro del estómago humano, las cuales fueron fabricadas a base de resina de poliuretano transparente; al interior de cada una de las cámaras se encuentra una membrana flexible hecha de caucho de silicón Ecoflex® 00-30 translúcido, lo que permite realizar visualización al interior del modelo. Las contracciones en las membranas son producidas por medio de líquido (agua), que se encuentra a una temperatura constante de 37°C . Para lograr los perfiles de presurización al interior de las cámaras, se utilizan dos cámaras de complianza que se encargan de transformar la presión neumática, proveniente de una línea de aire comprimido, en presión hidráulica. Para generar el flujo peristáltico se lleva a cabo la presurización de ambas cámaras complianza en forma alternada con el fin de generar un perfil de presión que reproduzcan las fases de propulsión y retropulsión presentes en el proceso de digestión gástrica. Por la parte superior del simulador se agregan los alimentos a procesar, así como el ácido clorhídrico y las enzimas gástricas; mientras que en la parte inferior se tiene un actuador flexible para imitar la contracción y dilatación del esfínter pilórico, y así generar el vaciado gástrico. Para realizar las mediciones de presión, al interior del modelo, se utilizó un catéter esofágico comercial modelo GIM-6000E.

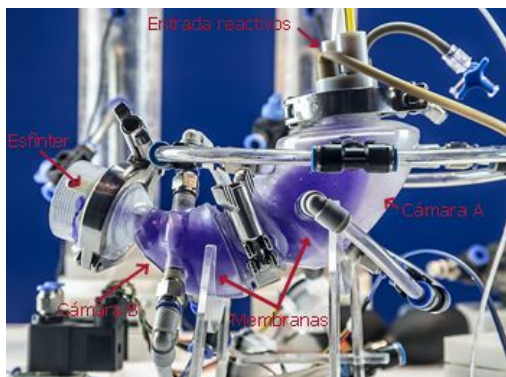


Fig. 1. Simulador gástrico distal *in vitro* (se utilizó una solución con tinta dentro de las membranas para mejor visualización)

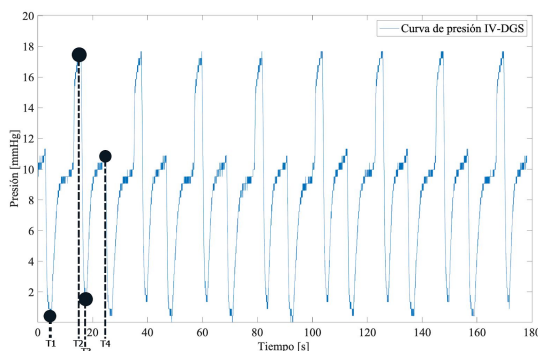


Fig. 2. Perfil de presión dentro del modelo IV-DGS durante un proceso digestivo.

3. Resultados y Discusión

Con el objetivo de cuantificar y obtener una validación del funcionamiento del modelo IV-DGS con respecto a los datos reportados en la literatura de estudios *in vivo* y en otros modelos *in vitro*, se realizaron dos pruebas iniciales. La primera se centró en medir el perfil de presión que se genera al interior de las membranas flexibles durante un ensayo de proceso de digestión y la capacidad de mezclado. La segunda prueba consistió en verificar la capacidad del modelo propuesto para generar desintegración de alimentos. Para todos los experimentos se programó una frecuencia de operación de 3 ciclos por minuto, presiones máximas de 25 mmHg (que son las que se presentan en un estómago adulto sano), y una temperatura de operación de 37°C.

Para la prueba de mezclado y evaluación del perfil de presión, se empleó como quimo una solución de agua destilada con goma guar (0.6% m/V), se calentó previamente a una temperatura de 37°C antes de introducirse en el modelo. Una vez el modelo estuvo en funcionamiento con el quimo en su interior, se dosificó 1 ml de azul de metileno (concentración 0.5%). El perfil de presión registrado se presenta en la Fig. 2. Como puede observarse, las presiones máximas generadas fueron de aproximadamente de 18 mmHg, el cual es un valor congruente con los reportados en estudios *in vivo* [8,14]. Por otro lado, el patrón del perfil de presión muestra la fase de la propulsión (T1-T2), es decir, cuando la presión se incrementa hasta aproximadamente 18 mmHg; la caída de presión que se produce cuando el esfínter pilórico se abre y se lleva a cabo el vaciado gástrico (T2-T3); y fase de retropropulsión que sucede cuando la presión se vuelve a incrementar hasta aproximadamente 11 mmHg por la contracción del esfínter pilórico (T3-T4) para propiciar que el quimo recircule y se fomente su mezcla con los jugos gástricos.

El tiempo registrado para obtener una muestra homogénea al interior de las membranas flexibles fue de aproximadamente 1500 s. La Fig. 3 muestra cinco fotografías del proceso de mezclado tomadas en intervalos de tiempo de 375 s. Como se puede observar el color dentro de las membranas pasa de

un tono blanquecino, cuando inicia la prueba, a un tono azul profundo cuando el proceso de mezclado finalizó.

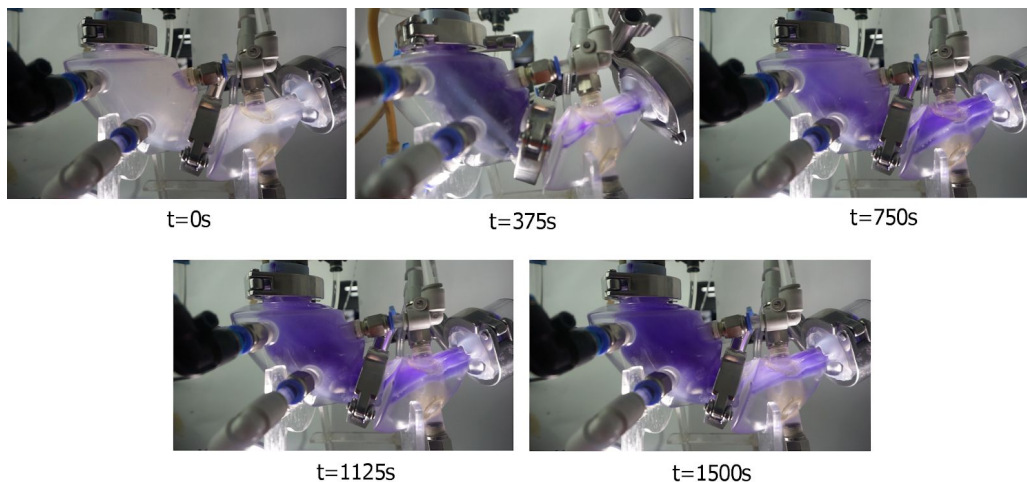


Fig. 3. Proceso de mezcla dentro del modelo IV-DGS.

Aunque el azul de metileno tiene la tendencia a decantarse hacia la región de la curvatura inferior del modelo, la difusión se logró en la solución, lo que representa un indicador de la capacidad del modelo para mezclar un quimo con las sustancias gástricas.

Para la prueba de desintegración de partículas sólidas se emplearon 100 g de melón cortado en cubos en un rango de 5-8 mm (Fig. 4A); previo a la colocación del melón en el modelo, se agregaron 25 ml de HCl con un pH de 1.9 para simular la fase cefálica del estómago; una vez colocado el melón dentro del modelo, se inició la prueba que tuvo una duración de 83 min. Durante este tiempo se dosificó HCl 5M con pH 1.5 a una tasa de 1 ml/min. Las presiones ejercidas por las membranas flexibles estuvieron en un rango entre 16-24 mmHg (Fig. 4D). La curva de pH obtenida durante el experimento se puede observar en la Fig. 4E. Finalmente, el melón resultante después del proceso digestivo puede observarse en Fig. 4B y 4C.

Como resultado de las evaluaciones realizadas es posible apreciar la importancia que tienen las variables de control en los modelos dinámicos *in vitro* del estómago humano para alcanzar resultados similares a los resultados obtenidos en estudios *in vivo*. Una de estas variables es el gradiente de presión, que en los estudios *in vivo* reportados no supera los 30 mmHg, mientras que en algunos de los modelos dinámicos reportados alcanza hasta 70 mmHg, lo cual puede generar una digestión simulada diferente a la digestión *in vivo*. Los gradientes de presión son de suma importancia en el proceso de desintegración del quimo debido a que genera los flujos necesarios para crear las fases de propulsión y retropropulsión, las cuales coadyuvan al mezclado de los jugos gástricos y enzimas con el quimo, favoreciendo la desintegración mecánica.

Los modelos *in vitro*, en su mayoría, han tratado de emular las condiciones gastrointestinales de la edad adulta, patologías como la fibrosis cística y cirugía de bypass gástrico, sin embargo, una limitante es su escasa aplicación bajo condiciones gastrointestinales infantil y tercera edad [15]. Con lo anteriormente mencionado, se demuestra como área de oportunidad para el modelo *in vitro* aquí presentado, la construcción de un protocolo de digestibilidad programable a partir del cual se recreen

las funciones específicas del tracto gastrointestinal humano de distintos grupos poblacionales, lo que potenciaría el número de aplicaciones de los modelos de digestión *in vitro* en el estudio y desarrollo de alimentos, así como formulaciones orales a medida de las necesidades de estos grupos poblacionales, incluyendo la detección temprana de posibles riesgos a la salud. El siguiente paso de la investigación es definir las variables del programa de control, a través del cual se adaptarán las diferentes condiciones gastrointestinales dependiendo del campo de aplicación y tipo de estudio. Esto se logrará a partir de un análisis más profundo de los protocolos de digestibilidad utilizados en la evaluación de los diferentes modelos de digestión *in vitro*, correlacionados con datos teóricos reportados en la literatura y datos obtenidos a partir de estudios *in vivo*.

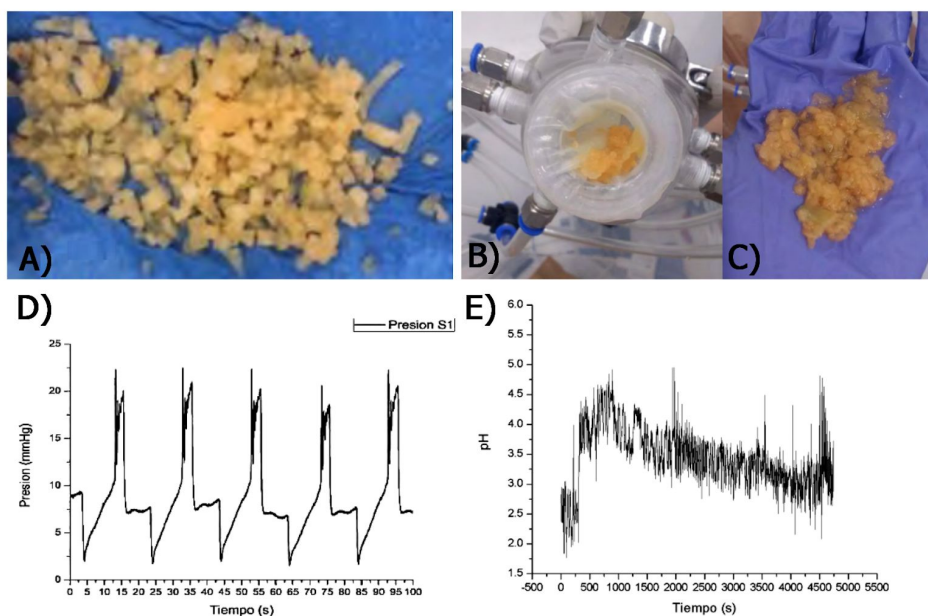


Fig. 4. Proceso de desintegración del modelo IV-DGS empleando melón.

4. Conclusiones

En este trabajo se presentó un panorama de los protocolos y modelos *in vitro* para realizar experimentos de digestibilidad, así como los principales campos de aplicación para este tipo de modelos. Con base en ello, se propuso y desarrolló el modelo *in vitro* del estómago presentado. Con los resultados obtenidos se demostró que el diseño desarrollado permite una aproximación adecuada al comportamiento real del estómago humano. En lo que respecta a rangos de presión se demostró que el perfil de presión es muy similar al registro *in vivo* reportado en [8]. También se demostró que el modelo es capaz de desintegrar el alimento y soportar altos niveles de acidez. Como trabajo a futuro se espera profundizar en el desarrollo de protocolos de digestibilidad para tratar de proponer un protocolo estándar.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés para este trabajo.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por los proyectos DGAPA-UNAM IN113319 y PE113019. Además, se agradece a Fresenius Kabi Deutschland GmbH y en particular al Dr. Edmundo Brito de la Fuente por el apoyo concedido. Se agradecen los comentarios técnicos aportados por el Dr. Gabriel Ascanio.

Referencias

- [1] I. J. Joye *et al.*, “A comprehensive perspective of food nanomaterials,” in *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st ed. New York, NY, U.S.A.: Elsevier, 2019, ch. 1, pp:1-45. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com>.
- [2] D. J. McClements and Y. Li, “Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems,” *Food & Funct.*, vol. 1, no. 1, pp. 32-59, 2010.
- [3] A. Guerra *et al.*, “Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 11, pp. 591–600, Nov., 2012.
- [4] R. Lucas-González, M. Viuda-Martos, J. A. Pérez-Alvarez, and J. Fernández-López, “*In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges,” *Food Res. Int.*, vol. 107, pp. 423–436, May, 2018.
- [5] F. Kong and R. P. Singh, “Disintegration of solid foods in human stomach,” *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 5, pp. R67–R80, Jun., 2008.
- [6] M. Minekus, “The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM),” in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 1st ed., Switzerland: Springer, 2014, ch. 5, pp: 37-46. [Online]. Available: <https://link.springer.com>.
- [7] M. Minekus *et al.*, “A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine,” *Altern. Lab. Anim.*, vol. 23, no. 2, pp. 197–209, Mar., 1995.
- [8] S. Bellmann, J. Lelieveld, T. Gorissen, M. Minekus, and R. Havenaar, “Development of an advanced *in vitro* model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology,” *Food Res. Int.*, vol. 88, pp. 191–198, Oct., 2016.
- [9] L. Barros, C. Retamal, H. Torres, R.N. Zúñiga, E. Troncoso, “Development of an *in vitro* mechanical gastric system (IMGS) with realistic peristalsis to assess lipid digestibility,” *Food Res. Int.*, vol. 90, pp. 216–225, Dic., 2016.
- [10] L. Chen *et al.*, “Gastric emptying and morphology of a ‘near real’ *in vitro* human stomach model (RD-IV-HSM),” *J. Food Eng.*, vol. 183, pp. 1–8, Aug., 2016.
- [11] Y. Li, L. Fortner, and F. Kong, “Development of a Gastric Simulation Model (GSM) incorporating gastric geometry and peristalsis for food digestion study,” *Food Res. Int.*, vol. 125, pp. 108598, Nov., 2019.
- [12] A. Brodkorb *et al.*, “INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion,” *Nat. Protoc.*, vol. 14, no. 4, pp. 991–1014, Mar., 2019.
- [13] H. Kozu *et al.*, “Mixing characterization of liquid contents in human gastric digestion simulator equipped with gastric secretion and emptying,” *Bioch. Eng. J.*, vol. 122, pp. 85-90, Jun., 2017.
- [14] S. Maqbool, H. P. Parkman, and F. K. Friedenber, “Wireless capsule motility: Comparison of the smartPill® GI monitoring system with scintigraphy for measuring whole gut transit,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 54, no. 10, pp. 2167–2174, Oct., 2009.
- [15] C. Shani-Levi *et al.*, “Extending *in vitro* digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 60, pp. 52–63, Feb., 2017.