

24.19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**AUTOMATIZACION DE EXPERIMENTOS
SOBRE PROPIEDADES
DE MEMBRANAS ARTIFICIALES**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

F I S I C O

P r e s e n t a:

Octavio Augusto Galindo Ortega

Abril de 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE:

	Pag.
Introducción _____	1
Capítulo I:	
La Membrana Celular _____	3
I.1 Lípidos _____	4
I.2 La Estructura de las Membranas Biológicas _____	8
Modelo de Mosaico Fluido _____	8
Las Funciones de la Membrana según el Modelo de Mosaico Fluido _____	12
Capítulo II:	
El Transporte a Través de la Membrana _____	13
II.1 Fundamentos Termodinámicos _____	13
II.2 Transporte Pasivo _____	16
II.3 Transporte Activo _____	17
II.4 Flujo de Sustancias _____	18
Ecuación de Harnst-Planck _____	18
Ecuación de Goldman _____	19
Coeficiente de Permeabilidad _____	20
Potencial de membrana en estado estacionario _____	21
II.5 Transporte de Agua _____	22
Presión Osmótica _____	22
Flujos de Agua _____	23
Selectividad _____	24
Capítulo III:	
Propiedades Eléctricas de las Membranas Artificiales _____	27
Membranas de Bicapa Lipídica _____	27
III.1 Capacidad Eléctrica de la MEL _____	28
III.2 Conductividad en las MEL _____	30
Conductancia en las Membranas Artificiales Modificadas _____	31
Poros Acuoso en Membranas Artificiales _____	33
Potencial para un ión univalente en un canal acuoso _____	37

Capítulo IV:

Implementación de una Técnica para Medir la Conductancia en Membranas Artificiales _____	41
IV.1 Mediciones con Corriente Directa _____	43
Capacidad Eléctrica _____	43
Resistencia _____	44
Sistema Utilizado en este Trabajo _____	45
Operación del Sistema _____	50
Calibración del Sistema _____	51

Capítulo V:

Automatización de la Captura de Datos en la Medición de la Conductancia de MBL _____	54
V.1 Muestreo de Señales _____	53
Teorema de Muestreo de Nyquist _____	53
V.2 Convertidores Analógico Digitales _____	52
V.3 Intefase de Conversión	
Analógico/Digital y Escritura Binaria. _____	63
Teoría de Operación _____	63

Apéndice A:

Diagramas Técnicos de los Circuitos Formateador y de Amplificación y Filtrado _____	71
--	----

Apéndice B:

Programas de Control y Procesamiento _____	72
B.1 Control del Experimento _____	72
B.2 Procesamiento de los Datos Experimentales _____	77
Listado del Programa de Control <i>Hidros.Pas</i> _____	82
Listado del Programa de Procesamiento <i>Archivos.Pas</i> _____	83

Bibliografía _____	107
--------------------	-----

INTRODUCCIÓN

El estudio de las membranas artificiales constituye uno de los tópicos clásicos en la biofísica contemporánea, ya que en algunos aspectos representan una buena caracterización de las membranas celulares biológicas. En particular aquellas membranas artificiales construidas con bicapas de lípidos, reproducen con buena aproximación algunas propiedades eléctricas de las membranas biológicas.

En el presente trabajo nos enfocaremos principalmente a la implementación de una técnica automatizada para medir los cambios que sufre la impedancia de las membranas de bicapa lipídica, (HBL) cuando son sometidas a la acción de antibióticos polienos.

La automatización de este tipo de experimentos, libera al investigador de realizar tareas rutinarias y tediosas, permitiendo incrementar el número de corridas y eliminando muchas fuentes de errores humanos. Con el sistema que presentamos en este trabajo, se resuelven también algunos de los problemas característicos de los experimentos en HBL, como controlar con precisión el tiempo durante el cual se hace pasar una corriente a través de la membrana, la activación de las resistencias de retroalimentación de los circuitos electrónicos amplificadores y, la captura y almacenamiento de los datos resultantes. Actualmente el sistema permite medir con fiabilidad resistencias en el rango de 10^3 a 10^5 ohms, lo que puede resultar insuficiente en algunos experimentos en donde se observan impedancias en membranas de 10^{10} ohms. Sin embargo, este sistema puede ser utilizado también para medir resistencias de valores que aún están fuera de la capacidad de los multímetros convencionales.

La interfase con el convertidor analógico-digital y las subrutinas de muestreo, —que se presentan en el Capítulo V y apéndice B, respectivamente—, pueden ser aprovechadas con cualquier transductor que tenga como salida una diferencia de potencial, y cuyos tiempos de muestreo estén en el rango del convertidor.

El programa de procesamiento de datos, puede ser utilizado con los datos de experimentos sobre impedancia en membranas artificiales, ya sea que éstos hayan sido obtenidos con el sistema que aquí se presenta o con algún otro.

Con el fin de introducirnos a la membrana celular, en el Capítulo I se presenta una breve introducción a la bioquímica de las moléculas que componen la estructura principal de la membrana celular. En seguida presentamos el *Modelo de Mosaico Fluido*, que es actualmente el modelo más aceptado para membranas biológicas.

En el Capítulo II se hace un importante análisis fisicoquímico de los distintos fenómenos de transporte a través de la membrana.

Las membranas artificiales, sus propiedades físicas, y los cambios de éstas en presencia de modificadores, se tratan en el Capítulo III. Se muestra también un modelo de los canales acuosos formados por el antibiótico nistatina en membranas de lípidos, y un cálculo teórico electrostático de la barrera de potencial inducida por dichos canales.

Los métodos para la medición de la conductividad, se analizan en el Capítulo IV. En este mismo capítulo, presentamos también el sistema experimental utilizado en el presente trabajo.

El Capítulo V trata sobre las técnicas para automatizar la adquisición de datos en dichos experimentos. Se comienza con un breve resumen de la teoría del muestreo, seguido de una introducción del proceso de conversión analógico/digital, y terminando con la presentación de la interfase utilizada para el control del sistema descrito en el capítulo anterior.

En los apéndices se muestran los detalles técnicos de los circuitos electrónicos, así como los programas de control y procesamiento utilizados en este trabajo.

En suma, en el presente trabajo se ha acondicionado una interfase acoplada con un convertidor analógico/digital para medir cambios de impedancia en membranas artificiales. Se han desarrollado, así mismo, los programas de captura y análisis de los datos experimentales. Resta por hacer una prueba extensa del sistema de adquisición de datos en experimentos con membranas artificiales, e implementar las modificaciones necesarias.

LA MEMBRANA CELULAR

La membrana celular no es una simple barrera inerte que aísla a la célula del medio que la rodea. Al contrario de esto, juega un importante papel en la selección, transporte y deshecho de las sustancias involucradas en las actividades fisiológicas de la célula. Además de estas funciones la membrana interviene en los fenómenos del contacto intracelular, interacciones con hormonas, y en respuestas inmunológicas. El núcleo celular y las mitocondrias también se encuentran recubiertos por membranas semejantes a la de la célula, aislando a estos del resto del citoplasma, e interviniendo de manera importante en sus funciones.

Las membranas biológicas están constituidas principalmente por proteínas, lípidos y agua. Los porcentajes de estos compuestos varían según la naturaleza de la célula. En la tabla I.1 se muestran los porcentajes de lípidos y proteínas en algunos tipos de células; aunque estos porcentajes en algunos casos pueden llegar al 100%.

Tabla I.1 Composición de algunas membranas biológicas. (1,3)

Especie	% proteínas	% lípidos
músculo de rata	63	19
axón de calamar	19	60
glóbulo rojo de hombre	53	47
bacteria <i>E. coli</i>	55	45

Uno de los principales objetivos en el estudio de las membranas celulares, es determinar como se organizan y operan los componentes de éstas, para llevar a cabo una gran diversidad de tareas. En base a propiedades observadas experimentalmente, se han construido diversos modelos de la membrana celular útiles para la comprensión de la organización y operación de ésta.

Algunas propiedades de interés físico de las membranas biológicas se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1.2 Propiedades físicas de las membranas biológicas (7)

espesor (Å)	40 - 120
tensión interfacial (erg/cm ²)	0.03 - 3.0
permeabilidad al agua (10 ⁻⁶ cm/s)	0.25 - 400
capacitancia (µF/cm ²)	0.5 - 1.3
resistencia (Ω·cm ²)	10 ² - 10 ³
diferencia de potencial en reposo (mV)	10 - 80
voltaje de ruptura (mV)	100

Varias de estas propiedades están relacionadas directamente con el transporte de materia a través de la membrana. Antes de introducirnos a un análisis fisicoquímico de este fenómeno, primero haremos una breve descripción de los compuestos que constituyen a la membrana, para posteriormente presentar un modelo de la estructura de la misma.

1.1 Lípidos:

Los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en agua, constituidos por hidrocarburos en su estructura principal, (1). Entre los lípidos se encuentran también algunas vitaminas y hormonas; y algunas veces se combinan con otras clases de biomoléculas resultando moléculas híbridas como los glicolípidos y las lipoproteínas (1).

La clasificación de los lípidos se basa en la estructura del espinazo de la molécula. Los lípidos complejos (acilglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras) se caracterizan por ser saponificables, ya que contienen ácidos grasos unidos entre sí covalentemente. El otro gran grupo son los lípidos simples que no

* Los Hidrocarburos son moléculas formadas por átomos de Hidrógeno unidos a una cadena de átomos de Carbón. Estos se unen entre sí por medio de enlaces covalentes sencillos o dobles.

contienen ácidos grasos, por lo que no son saponificables como los primeros.

Los ácidos grasos constan de una larga cadena de hidrocarburos terminada en un grupo carboxil. La cadena de hidrocarburos puede ser saturada (ácido palmítico), o bien puede presentar uno o más enlaces dobles (ácido oleístico). Algunos pocos poseen enlaces triples. Los ácidos grasos difieren entre sí principalmente por la longitud de la cadena y por el número y posición de los enlaces no saturados. En plantas y animales superiores, los ácidos grasos más abundantes tienen un número par de carbonos y cadenas entre 14 y 22 átomos de longitud, y por lo general son no saturados.

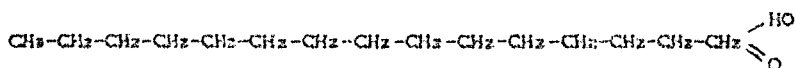


Fig. I.1 ácido palmítico.

Debido a que en los enlaces grasos saturados los enlaces son simples, la cadena de hidrocarburos es flexible y puede presentar un gran número de posiciones en el espacio. Cuando esta cadena se extiende completamente, alcanza el estado de mínima energía, por lo que es la forma que presenta con más frecuencia. Por su parte, los ácidos grasos no saturados tienen uno o más enlaces dobles, produciendo así puntos rígidos en la cadena que delimitan el número de posiciones que ésta puede asumir.

Uno de los grandes subgrupos de lípidos complejos, lo constituyen los *fosfoglicéridos*, (también llamados fosfátidos glicéridos, o fosfolípidos). Son los principales componentes de la membrana celular, y es poco común encontrarlos en otras partes de la célula. El colesterol, —del que hablaremos más adelante—, forma parte de este subgrupo. En estos lípidos uno de los grupos hidroxil de glicerol está esterificado al ácido fosfórico, los otros grupos hidroxil lo están a ácidos grasos. Los

fosfoglicéridos poseen una cabeza polar unida a una o más colas no polares de hidrocarburos (Fig. 1.2), de modo que son llamados anfipáticos o polares. Los tipos diferentes de fosfoglicéridos se distinguen entre sí por el tamaño, la forma y la carga eléctrica de los grupos de la cabeza polar, (dichas variaciones juegan un papel importante en la estructura de varios tipos de membranas). Cada uno de estos tipos puede existir en muchas especies químicas, dependiendo de los sustitutos de sus ácidos grasos; generalmente hay uno saturado y otro insaturado, este último en la posición 2 del glicerol.

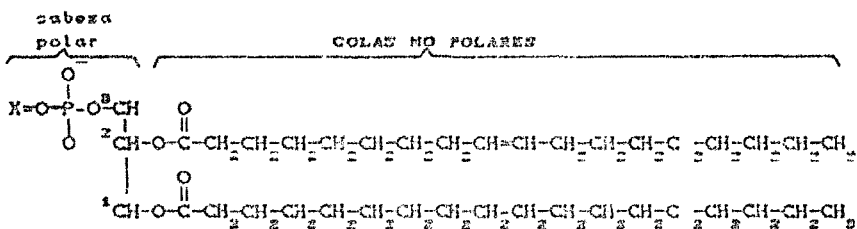


Fig. 1.2 Estructura general de los fosfoglicéridos.

El aspecto de los fosfoglicéridos es blanco ceroso. Al contacto con la atmósfera sus ácidos grasos poliinsaturados se oxidan y son solubles en la mayoría de los solventes no orgánicos que contengan agua, aunque es difícil disolverlos en acetona anhidrida.

Si se agregan fosfoglicéridos al agua, sólo una pequeña porción de ellos se disuelve en una solución molecular verdadera; más allá de una concentración crítica, los lípidos polares se asocian en varios tipos de agregados conocidos como micelas. En tales estructuras las colas de hidrocarburos se ocultan del ambiente acuoso formando una fase hidrofóbica, mientras que las cabezas hidrofílicas quedan expuestas en la superficie

(Fig. 1.3a). Los lípidos polares también forman monocapas (Fig. 1.3b) en interfaces aire-agua, y bicapas que separan dos compartimientos acuosos. En este último tipo de estructuras, —formadas por lípidos polares—, las cadenas de hidrocarburos (hidrofóbicas) están orientadas hacia adentro de la membrana formando así una fase continua de hidrocarburos, mientras que sus cabezas hidrofílicas quedan orientadas hacia el extremo de ambas superficies de la bicapa (Fig. 1.3c). Cuando una de estas bicapas se expone a oscilaciones sónicas, se forman estructuras vesiculares completamente cerradas llamadas liposomas (Fig. 1.3d).

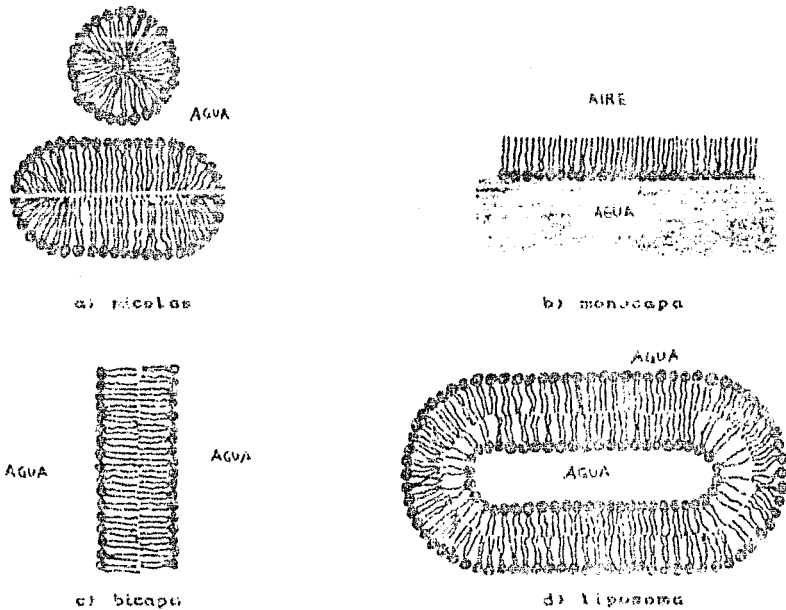


Fig. 1.3 Estructuras formadas por lípidos polares en contacto con medios acuosos. Escala $1:2 \times 10^5$

12 La Estructura de las Membranas Biológicas:

A pesar de la gran diversidad que presentan las proteínas en su estructura, algunos autores consideran que es posible hacer algunas generalizaciones útiles para la comprensión de las propiedades y funciones de las moléculas de proteína. De la misma manera, es posible que existan generalizaciones válidas sobre la manera en que los lípidos y las proteínas se organizan en una membrana intacta.

En 1935 H. Davson y J. Danielli (1), propusieron que la membrana celular contenía fases continuas de hidrocarburos proporcionadas por los lípidos. Años después, se formuló la hipótesis de la membrana unitaria, en la que se considera que la membrana tiene una estructura tipo bicapa. Además se pensaba que cada una de estas superficies, estaba completamente cubierta por una capa monomolecular de proteínas con sus cadenas de polipéptidos descansando en forma extendida. El grosor total de la membrana se calculaba entre 8 y 9 (nm), mientras que el de la bicapa de lípidos oscilaba entre 5 y 7 (nm). Posteriormente se propusieron los modelos globulares o subunitarios, en los que la membrana se consideraba formada por láminas de lipoproteínas cuyo diámetro variaba de 4 a 9 (nm).

El modelo más satisfactorio de la estructura de las membranas biológicas, parece ser el modelo de *mosaico fluido*, formulado en 1972 por S.J. Singer y G.L. Nicolson (2), en base a argumentos termodinámicos de sistemas macromoleculares y resultados experimentales. Este modelo considera a la membrana como una estructura de mosaicos de *proteínas globulares* alternadas en una bicapa de fosfolípidos (Fig. 1.4). El mosaico parece ser una solución viscosa orientada en dos dimensiones. Es importante destacar que este modelo es aplicable a la mayoría de las membranas biológicas funcionales, tales como las plasmáticas e intracelulares, incluyendo las membranas de distintos organelos como las mitocondrias y cloroplastos. Otros tipos de membranas como la mielina y las lipoproteínas, parecen ser rígidas en vez de fluidas.

Los principios termodinámicos involucrados en este modelo, son generales y se aplican a cualquier sistema macromolecular en un medio acuoso. Las interacciones *no covalentes* más importantes a considerar, son las *hidrofóbicas* y las *hidrofilicas*. Las primeras son las responsables de la repulsión de los grupos no polares al agua; este efecto sumado sobre muchos residuos de aminoácidos de proteínas solubles, es de gran importancia al determinar la conformación que adoptan estas moléculas en las soluciones acuosas. En este tipo de soluciones, los residuos no polares son

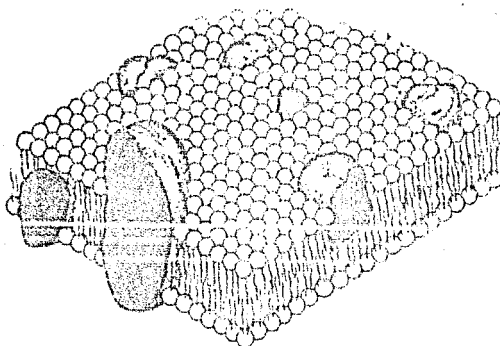


Fig. 1.4 La membrana celular según el modelo del mosaico fluido.

encapsulados en el interior de las moléculas lejos del contacto con el agua. Por interacciones hidrofilicas, se conocen aquellas que son responsables de la preferencia que tienen los grupos iónicos y polares por un medio acuoso.

Las interacciones electrostáticas y los enlaces de hidrógeno, son también fenómenos no covalentes que contribuyen a determinar la estructura molecular de la bicapa; sin embargo, comparadas con las hidrofóbicas e hidrofílicas, son probablemente de segunda magnitud.

En la estructura de bicapa de lípidos, las cadenas de ácidos grasos (no polares) de los fosfolípidos de ambas secciones, quedan encontrados y separados del agua maximizando así las interacciones hidrofóbicas. Por su parte, los grupos anfipáticos e iónicos de las cabezas, quedan en contacto directo con la fase acuosa formando ambas superficies de la bicapa, maximizando así las interacciones hidrofílicas. En la figura 1.3c se muestra la configuración que adoptan los lípidos al formar una bicapa. En el caso de los fosfolípidos anfipáticos, las interacciones dipolo-dipolo entre los pares de iones contribuyen posiblemente a la estabilización de la estructura de la membrana.

El modelo del mosaico fluido considera que las proteínas juegan un papel predominante en las membranas funcionales, por lo que la estructura misma de las proteínas es de gran importancia. Las proteínas se clasifican en *periféricas* e *integrales*. Las primeras, se caracterizan por ser fáciles de disociar molecularmente de la membrana, con solo alterar ligeramente las fuerzas iónicas del medio. Esto sugiere que probablemente están unidas a la bicapa por medio de interacciones electrostáticas débiles no covalentes. Sin embargo, en la mayoría de las membranas el 70% de las proteínas son del tipo integral, que al contrario de las periféricas, se caracterizan por la dificultad de disociarlas de la bicapa. Para lograr esto, es necesario el empleo de agentes como detergentes, ácidos biliares, y solventes orgánicos; aunque se les logre disociar, usualmente retienen algunos lípidos con ellas, cosa que no sucede con las periféricas. Es importante destacar que este modelo propone que sólo las proteínas de tipo integral, son críticas para la integridad estructural de la membrana.

Las proteínas integrales en una membrana intacta son principalmente de forma globular, (Lenard, 1966). Con esta característica, el modelo concuerda satisfactoriamente en lo que se refiere al grosor generalmente observado en las membranas biológicas, que es de 7.5 a 9 (nm). Las moléculas globulares de proteínas integrales, se alternan con secciones de la bicapa de

fosfolípidos. Estas moléculas son estructuralmente asimétricas con un extremo altamente polar y otro no polar (anfipáticas). La región polar está formada por residuos de aminoácidos iónicos que apantallan a los residuos sacáridos unidos covalentemente. Esta región queda expuesta al medio acuoso como se muestra en la figura I.5. Por su parte, el extremo no polar de la proteína está exento de residuos iónicos y sacáridos, y contiene muchos residuos no polares; así queda enclavada en el interior hidrofóbico de la bicapa de fosfolípidos. La estructura anfipática adoptada por alguna proteína en particular, está determinada por la secuencia de aminoácidos y por la estructura covalente de la proteína; alcanzando un estado de mínima energía. Una proteína integral, con un tamaño y estructura apropiados, puede llegar a atravesar completamente la bicapa, teniendo regiones en contacto con el agua y otras en contacto con la fase hidrofóbica.

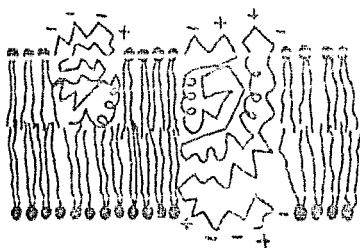


Fig. I.5

Así, distintos tipos de proteínas que tengan una secuencia de aminoácidos apropiada para adoptar una estructura anfipática, pueden ser proteínas integrales. Esto explica la extensa heterogeneidad de proteínas que presentan la mayoría de la membranas funcionales, así como también se explica por qué algunas proteínas están unidas a la membrana y otras disueltas libremente en el citoplasma. Las interacciones entre las mismas proteínas, pueden ser muy importantes al determinar las propiedades de este modelo; y también es posible que den por resultado el envolvimiento de una proteína integral por una periférica. Sin embargo, este hecho no altera significativamente la estructura básica de la membrana.

Las Funciones de la Membrana según el Modelo de Mosaico Fluido:

El carácter fluido del mosaico es importante en aquellos fenómenos que ocurren en escalas de tiempo mayores que las de la difusión de los componentes de la membrana. Para fenómenos tales como la excitación nerviosa, la membrana se comporta como una estructura rígida.

Entre los mecanismos que tienen lugar en la superficie de la membrana y que concuerdan satisfactoriamente con el modelo, están los efectos transmitidos entre dos sitios remotos de la membrana. De este tipo de fenómenos podemos distinguir dos clases: los *trans* y los *cis*. Los primeros son aquellos cambios cooperativos que operan en alguna región bien localizada de la superficie de la membrana y que se transmiten a la superficie opuesta de la misma. Como ejemplo de esta clase de fenómenos podemos mencionar el reordenamiento de una subunidad de proteínas que emergen de ambas superficies, al ser activada por una droga o hormona específica. Por su parte, se conocen como fenómenos *cis* a aquellos cambios cooperativos que pueden ser producidos sobre toda la membrana o en grandes áreas de ella. Estos se producen como consecuencia de algún evento ocurrido en pocos sitios bien localizados. Como ejemplo de estos fenómenos tenemos los efectos mortales de ciertos bacteriocitos en bacterias, y la interacción del crecimiento hormonal con membranas de eritrocitos. Estos y otros muchos mecanismos basados en la fluidez de la bicapa de lípidos, pueden ser extensamente discutidos, sin embargo quedan fuera del tema de este trabajo, en el que trataremos sobre el movimiento de iones y agua a través de la membrana.

Capítulo II

EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

Independientemente del modelo de membrana que se trate, existen características generales de los mecanismos de transporte a través de ellas. Primeramente entenderemos por membrana una fase que actúa como una barrera para prevenir el movimiento de masa, pero que permite el flujo regulado y/o restringido de una o varias especies de solutos a través de ella.

Cuando una membrana separa dos fases acuosas, varias fuerzas que actúan sobre ella pueden producir un flujo de moléculas o de ciertas especies iónicas. Estas fuerzas resultan de los gradientes que se establecen entre las dos fases, los cuales pueden ser de origen químico, eléctrico, mecánico y térmico. Las diferentes combinaciones de éstas fuerzas y las características estructurales de la membrana, determinarán los distintos tipos de transporte a través de ella. En las membranas biológicas tienen lugar cuatro formas fundamentales de transporte: el transporte pasivo, el transporte activo, la difusión y el transporte acoplado. En este capítulo se presenta un análisis básico del transporte pasivo, transporte activo, difusión simple y transporte de agua. Primeramente presentaremos una breve introducción de los conceptos termodinámicos básicos involucrados en el análisis de los fenómenos de transporte.

II.1 Fundamentos Termodinámicos:

La energía de Gibbs juega un papel fundamental en el estudio de los sistemas químicos, en los que la composición de las fases es importante, y en los que ocurre transferencia de masa a presión y temperatura constantes, (ΔG) . En los sistemas químicos la energía de Gibbs depende de la composición de las fases que constituyen el sistema.

Formalmente, en una fase, la energía de Gibbs está dada por:

$$G(T, p, n_i) = U - TS + pV \quad (1)$$

donde U es la energía interna de la fase, S es la entropía, T la temperatura, p la presión, y V el volumen de la fase.

La energía de Gibbs es una medida del trabajo disponible en un proceso reversible a presión y temperatura constantes. Es por esta razón por lo que algunas veces es llamada energía libre de Gibbs.

En los sistemas químicos, la energía de Gibbs depende de la concentración molecular de los componentes en la forma:

$$G = \sum \mu_i n_i \quad (2)$$

donde μ_i y n_i son respectivamente el potencial químico y el número de moles de la i -ésima fase. En los procesos espontáneos, la energía de Gibbs tiende a minimizarse, i.e.: $\Delta G = \sum \Delta G_i \leq 0$. Este hecho se conoce como el principio de minimización de la energía de Gibbs.

De la ec.2 obtenemos el potencial químico de una sustancia en una fase:

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p, V, n} \quad (3)$$

En un sistema de un componente, el cambio en el potencial químico de la i -ésima fase está dado por:

$$d\mu_i = -s_i dT + v_i dp \quad (4)$$

Si en un gas a temperatura constante, integramos la ec.4 respecto a una presión de referencia p_0 , (5) obtenemos:

$$\mu_i - \mu_i^0 = RT \cdot \ln \frac{p}{p_0} \quad (5)$$

Esta expresión representa una relación entre μ_i y la presión que es accesible a través del experimento. La cantidad μ_i^0 es el potencial químico para un gas ideal a una presión p_0 .

Se define (6) a la *fugacidad* de una sustancia en una fase en términos del potencial químico de la siguiente manera:

$$\mu_i(T, p, x_i, x_2, x_3, \dots) = \mu_i^0 + RT \cdot \ln \frac{f_i}{f_i^0} \quad (6)$$

Aquí, μ_i^0 y x_i son el potencial químico y la fracción molar (en fase condensada) de la i -ésima sustancia en el estado de fugacidad f_i^0 . Algunas veces es conveniente definir como el estado normal de un gas a temperatura T , cuando la presión es de 1 atm. En este caso $f_i^0 = 1$ atm, y las causas de que f_i cambie a partir de este valor, son debidas a los cambios de la presión parcial de la i -ésima componente. Para un gas puro, $f_i = p_i$; de manera similar, en cualquier mezcla de gases ideales es igual a la presión parcial, $f_i = p_i = y_i p$, en donde y_i es la fracción molar de la i -ésima componente en fase gaseosa. Así, en el límite, cuando la densidad tiende a cero, obtenemos:

$$\lim_{p \rightarrow 0} f_i = y_i p \quad (7)$$

Por lo tanto, las fugacidades tienen unidades de presión, comúnmente atmósferas. A la cantidad adimensional f_i/f_i^0 se le denomina actividad " a_i " de la i -ésima sustancia, por lo que la ec. 6 puede escribirse como:

$$\mu_i(T, p, x_i, x_2, x_3, \dots) = \mu_i^0 + RT \cdot \ln a_i \quad (8)$$

La actividad es una medida de que tan "activa" es una sustancia comparada con el estado normal a la misma temperatura. La actividad depende de la concentración C de la sustancia en la forma $a_i = \gamma_i C_i$, donde a γ_i se le conoce como *coeficiente de actividad* y en sistemas reales depende de la composición. Ni la fugacidad ni la actividad tienen significado por sí mismos hasta que no se conoce el estado normal utilizado en su determinación.

El potencial electroquímico de una sustancia en una fase es el potencial químico más el potencial eléctrico. En el caso de especies iónicas, a un incremento de la concentración, resulta también un cambio de energía debido a la diferencia de potencial. Cuando se trata de sustancias iónicas además del potencial químico se tiene un potencial eléctrico por mol dado por: $zF\psi$, donde F es la constante de Faraday, z la valencia de la i -ésima especie, y ψ el potencial eléctrico de la fase. Así, tenemos que el potencial electroquímico $\tilde{\mu}$ puede escribirse como:

$$\tilde{\mu} = \mu + zF\psi = \mu^0 + RT \ln a_i + zF\psi \quad (9)$$

II.2 Transporte Pasivo:

El transporte pasivo es aquel en el que hay transporte de materia producido por gradientes de potencial electroquímico. Se dice que una especie iónica está en equilibrio con otra cuando su potencial electroquímico es el mismo en las dos fases. En este caso no existe flujo neto del ión a través de la membrana, (6).

Consideremos ahora una membrana que separa dos sustancias 1 y 2. En el estado de equilibrio termodinámico $\tilde{\mu}_1 = \tilde{\mu}_2$, por la ec. 9 tendremos:

$$RT \cdot \ln a_1 + zF\psi_1 = RT \cdot \ln a_2 + zF\psi_2 \quad (10)$$

que puede escribirse como:

$$\psi_2 - \psi_1 = V = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \left[\frac{a_1}{a_2} \right] \quad (11.a)$$

o como:

$$\frac{a_1}{a_2} = e^{(zFV/RT)} \quad (11.b)$$

Esta expresión se conoce como ecuación de Nernst. El símbolo V en las ecs. 11, representa el llamado potencial de membrana o potencial de equilibrio de ión. Como puede verse, la ecuación de

Nernst permite calcular la magnitud y el sentido del potencial de membrana, cuando —en el equilibrio termodinámico— se conocen las concentraciones. Es importante destacar que las cargas que generan el potencial de membrana, sólo se hallan en la superficie de las caras de ésta, pues el medio que conforma a la membrana es conductor; es decir, una membrana que separa dos soluciones es una capa polar.

II.3 Transporte Activo:

Se dice que hay transporte activo cuando este ocurre contra gradientes de potencial electroquímico, ($\Delta\phi$).

El transporte activo implica un incremento en la energía libre del soluto transportado (ΔG_i), cuyo valor por mol está dado por:

$$\Delta G_i = \mu_2 - \mu_1 = RT \cdot \ln \left(\frac{c_2}{c_1} \right) + zF(\phi_2 - \phi_1) \quad (12)$$

Como un proceso del tipo $\Delta G_i > 0$ no se verifica espontáneamente, la transferencia de un soluto por transporte activo sólo tendrá lugar si se asocia a otro proceso que implique reducción de energía libre ($\Delta G_e < 0$), de tal forma que $\eta \Delta G_i + \Delta G_e < 0$, donde η es el coeficiente estequiométrico que expresa el número de moles de soluto transferido por mol de sustancia transformada durante el proceso que aporta la componente negativa de la energía libre. Al proceso que suministra ΔG_e se le denomina *fuerza de energía*. Si se conoce la estequiometría y la fuente de energía, será posible calcular la diferencia máxima de potencial electroquímico. Si no hay transporte pasivo, el sistema tenderá al estado en que $\eta \Delta G_i + \Delta G_e = 0$. El valor de ΔG_i que satisface esta ecuación es la diferencia máxima de potencial electroquímico que el sistema es capaz de generar. La conservación de una distribución estacionaria requiere del suministro continuo de sustrato a la fuente de energía, que en la célula lo hace el metabolismo.

II.4 Flujo de Sustancias:

Por difusión simple se entiende el desplazamiento de materia producido por gradientes de potencial químico. Así mismo, cuando existe un gradiente de potencial eléctrico, las translaciones individuales tendrán una resultante en la dirección definida por la carga de la partícula. Así, en las sustancias electrolíticas, la presencia de gradientes de potencial eléctrico también produce transferencia de masa.

Ecuación de Nernst-Planck:

Analizaremos ahora el movimiento de una partícula sobre la cual actúa una fuerza impulsora F_{imp} , pero que a su movimiento se opone otra fuerza de fricción $F_{fric} = f \cdot v$, donde f es el coeficiente de fricción. La partícula alcanzará una velocidad terminal cuando $F_{imp} = F_{fric}$, es decir $F_{imp} = f \cdot v$. Esta relación se puede escribir como $v = u \cdot F_{imp}$, donde $u = 1/f$ se denomina movilidad.

Considérese una superficie de área A perpendicular a la dirección de movimiento de partículas que viajan con velocidad v . Entonces, el número de moles que atraviesan la superficie por unidad de tiempo será $v \cdot A \cdot C$, donde C es la concentración. Así, el flujo J que es la cantidad de masa que se transporta por unidad de área y tiempo será:

$$J = v \cdot C = u \cdot F_{imp} \cdot C \quad (12)$$

En las sustancias que nos interesan, las fuerzas que producen flujos son los gradientes de potencial electroquímico; que en el caso de una membrana plana está dada por:

$$F_{imp} = -\frac{d\mu}{dx} = -\frac{RTda}{a dx} - zF \frac{d\psi}{dx} \quad (14)$$

En donde x es la dirección perpendicular a la membrana. En

equilibrio se tiene que $d\mu/dx = 0$ por lo que:

$$\frac{RT}{a} \frac{da}{dx} = - zF \frac{d\psi}{dx} \quad (15)$$

Como el último término de la ec.15 corresponde a la fuerza eléctrica, entonces encontramos que el miembro izquierdo de la ec.15 es también una fuerza, que en el equilibrio se opone a la fuerza del campo eléctrico y la anula. Así, la ec.13 puede escribirse como:

$$J = - \frac{uRT}{a} \frac{da}{dx} - zFv \frac{d\psi}{dx} \quad (16)$$

u y a son respectivamente, la movilidad y la actividad en el interior de la membrana, donde da/dx y $d\psi/dx$ son distintas de cero. La ecuación 16 es llamada ecuación de *Hernst-Piccock*, y es importante subrayar que tiene validez general para la descripción de flujos pasivos por difusión, siempre que el flujo de un soluto no se vea afectado por el de los otros solutos o el disolvente.

Ecuación de Goldman:

Si se propone que el potencial eléctrico varía linealmente a lo largo de la membrana de espesor b en la forma $d\psi/dx = -V/b$, y que los coeficientes de actividad son constantes, (hipótesis de campo constante), entonces es posible integrar la ec. 16 obteniendo:

$$J = - uRT \frac{dC}{dx} + zFCv \frac{V}{b} \quad (17)$$

Considerando que en estado estacionario el flujo es constante, y que las concentraciones en la superficie de la membrana son proporcionales a la concentraciones de las soluciones que las bañan, —i.e.: $C_1 = \beta C_1$, y $C_2 = \beta C_2$; donde β es un coeficiente de partición—, podemos integrar la ec.17 para obtener la llamada

ecuación de Goldman para el flujo:

$$J = \frac{u_0 \beta V}{\delta} \left(\frac{C_2 - C_1 \cdot e^{-zFV/RT}}{1 - e^{-zFV/RT}} \right) \quad (18)$$

La ecuación de Goldman muestra que si el potencial de membrana y una de las concentraciones se mantienen constantes, entonces el flujo del soluto será una función lineal creciente de la concentración del soluto en la solución que baña a la superficie opuesta de la membrana. Por otra parte, cuando las concentraciones de masa son iguales el flujo será directamente proporcional a V . Como los flujos que expresa la ec. de Goldman son pasivos, deben de anularse en el equilibrio, como se discutió anteriormente.

Coefficiente de Permeabilidad:

Consideremos ahora el caso en el que no hay potencial de membrana o el soluto no tiene carga neta; entonces de la ec.18 obtenemos la ley de Fick para la difusión:

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} = -\frac{RT}{f} \frac{dC}{dx} \quad (19)$$

donde el factor $RT/f = D$ es la expresión de Einstein para el coeficiente de difusión D . Cuando $|zFV/RT| \ll 1$, y $V=0$ o $z=0$ la ecuación de Goldman toma la forma:

$$J = \frac{D\beta}{\delta} (C_1 - C_2) \quad (20)$$

A $P \equiv D\beta/\delta$ se le conoce como el coeficiente de permeabilidad de la membrana para el soluto. Depende del coeficiente de partición del soluto entre la membrana y las disoluciones, del coeficiente de difusión del soluto en la membrana, y del grosor de la misma. Así podemos reescribir la ecuación 18 de la siguiente manera:

$$J = P \frac{zFV}{RT} \left(\frac{[C_2 - C_1] e^{-zFV/RT}}{1 - e^{-zFV/RT}} \right) \quad (21)$$

El Potencial de Membrana en Estado Estacionario:

Hasta ahora vimos como los flujes son dependientes de la composición del sistema. Ahora estudiaremos como dada la composición se determina la distribución de potencial eléctrico. Para ésto integraremos la ecuación de Nernst-Planck. Dada la complejidad de los sistemas de varios componentes, no existe una solución general para un sistema de Nernst-Planck, (8). Algunas simplificaciones permiten encontrar soluciones que tienen utilidad práctica. Una de estas es la ecuación de Goldman para el potencial.

Considerando sólo iones monovalentes ($z=1$), el flujo total de cationes (+) de n especies diferentes será:

$$\sum J_+ = \frac{FV}{RT(1-\delta)} \left\{ \sum^j p \cdot j C_2^+ - \sum^j p \cdot j C_1^+ \cdot \delta \right\} \quad (22)$$

donde $\delta \equiv e^{-FV/RT}$; y jC y jP son la concentración y el coeficiente de permeabilidad de la j -ésima especie. El flujo total de aniones (-) de n especies diferentes está dado por:

$$\sum J_- = \frac{-FV}{RT(1-\delta)} \left\{ \sum^j p \cdot j C_1^- - \sum^j p \cdot j C_2^- \cdot \delta \right\} \quad (23)$$

Habrá electroneutralidad sólo cuando $\sum J_- = \sum J_+$, que por las expresiones anteriores y despejando V obtenemos:

$$V = \frac{RT}{F} \cdot \ln \left[\frac{\sum^j p \cdot j C_1^+ + \sum^j p \cdot j C_2^-}{\sum^j p \cdot j C_2^+ + \sum^j p \cdot j C_1^-} \right] \quad (24)$$

Esta es la ecuación de Goldman para el potencial de membrana. Por ejemplo, si se conocen las concentraciones y permeabilidades del Na^+ , K^+ , y Cl^- , toma la siguiente forma:

$$V = \frac{RT}{F} \cdot \ln \left[\frac{P_{K^+} [K^+]_1 + P_{Na^+} [Na^+]_1 + P_{Cl^-} [Cl^-]_2}{P_{K^+} [K^+]_2 + P_{Na^+} [Na^+]_2 + P_{Cl^-} [Cl^-]_1} \right] \quad (25)$$

II.5 Transporte de Agua:

Presión Osmótica:

Dado que en las células existen membranas que son permeables al agua pero impermeables a los solutos, consideraremos ahora una membrana que se comporta de esta manera, y que separa una solución acuosa de una región de agua pura, (0). Debido a que el potencial electroquímico del agua pura es mayor que el de la solución acuosa, habrá transporte pasivo de agua pura hacia la solución. Es posible detener este flujo aplicando a la solución una presión π , llamada presión osmótica. De esta manera aparece un nuevo potencial μ'_i en la solución, de tal forma que $\mu_0 = \mu_i + \mu'_i$.

Podemos calcular el valor de μ'_i si integramos el cambio de μ_i a medida que cambia de presión sobre la solución, y manteniendo constantes a los otros parámetros. Así, cuando \mathcal{P} es la presión atmosférica:

$$\mu'_i = \int_{\mathcal{P}}^{\mathcal{P} + \pi} \left(\frac{\partial \mu_i}{\partial \mathcal{P}} \right)_{T, V, n} d\mathcal{P} \quad (26)$$

El integrando de esta expresión es el llamado volumen molar parcial de la componente i . Llamándolo $V^{\#}$ y suponiendo que no cambia al variar \mathcal{P} , obtenemos que el valor para μ'_i es $V^{\#} \pi$. Por lo tanto en el equilibrio se cumplirá que:

$$\mu_i = \mu_0 - V^{\#} \pi \quad (27)$$

Que es una función lineal decreciente de π . Así, podemos concluir que dados dos compartimentos separados por una membrana impermeable a los solutos, el agua se desplazará hacia el que tenga mayor presión osmótica hasta que éstas se igualen en ambos compartimentos. En sustancias diluidas, la presión osmótica estará dada por la llamada ecuación de Van't Hoff:

$$\pi = RTC \quad (28)$$

Es importante destacar que sólo producirán diferencias permanentes de presión, aquellos solutos que se retengan en uno de los compartimientos separados por la membrana. Los solutos que no son retenidos en uno de los compartimientos, determinan la transferencia de agua, la cual es siempre menor a la predicha por las ecuaciones de presión osmótica. Esta transferencia de agua es transitoria, ya que el efecto osmótico de solutos que atraviesan la membrana desaparece a medida que éstos se equilibran a ambos lados de aquella.

Flujos de Agua:

Al igual que los solutos, el flujo neto de agua a través de la membrana estará determinado por el producto de la movilidad, la concentración y la fuerza impulsora, (29). La movilidad y la concentración son las correspondientes al interior de la membrana y la fuerza impulsora es derivable del potencial, i. e.:

$$J = - u \cdot C_v \frac{\partial \mu}{\partial x} \quad (29)$$

Donde C_v es la concentración molar del agua en la membrana. Para una membrana de grosor b y utilizando el mismo razonamiento de la sección anterior, tenemos que $\mu_v = \mu_l + V^a p$, donde V^a es el volumen molar parcial del agua, μ_l es el potencial a presión atmosférica y p la presión hidrostática en exceso a la atmosférica. Derivando con respecto a x y sustituyendo en la ecuación 29, obtenemos:

$$J = - u \cdot C_v \left[\frac{\partial \mu_l}{\partial x} + V^a \frac{\partial p}{\partial x} \right] \quad (30)$$

Como la membrana es muy delgada y los gradientes en ella son constantes, y teniendo en cuenta que $\mu_l = \mu_0 - V^a \pi$, obtenemos:

$$J = - u \cdot C_v \frac{V^a}{b} (\Delta p - \Delta \pi) \quad (31)$$

A $\beta = C_v V^a$ se le conoce como coeficiente de partición del agua

entre la solución y la membrana. Así, el flujo puede expresarse como:

$$J = -\frac{v_2}{\delta}(\Delta p - \Delta \pi) \quad (32)$$

Es importante destacar que este tratamiento sólo es válido cuando la membrana es impermeable a los solutos que generan la presión osmótica.

Selectividad:

La capacidad de seleccionar con alto grado de precisión las sustancias de estructura química similar, es común a todos los mecanismos de transporte, y capacita a las membranas biológicas para su papel regulador de los intercambios de materiales entre la célula y el medio. A esta capacidad de las membranas se le denomina *selectividad*. En el caso de la difusión simple, la selectividad se expresa cuantitativamente por la razón de los coeficientes de permeabilidad. Así, se dice que una membrana es selectiva para el ión *i* respecto al ión *j* si:

$$\frac{P_i}{P_j} > 1 \quad (33)$$

En la sección II.4 se demostró que el flujo al interior de una membrana está dado por la ec.18. Distinguiendo la *i*-ésima especie, y recordando que $C = \gamma a$, podemos escribir dicha ecuación de la siguiente forma:

$$J_i = -v_i RT \frac{dC_i}{dx} - v_i + F v_i C_i \frac{d\psi}{dx} = -D_i \left[\frac{dC_i}{dx} + \frac{C_i F}{RT} \frac{d\psi}{dx} \right] \quad (34)$$

Integrando la ec.34 utilizando la hipótesis de campo constante y la ec.21, obtenemos:

$$\frac{P_-}{P_+} = \frac{e^{FV/RT}(C_2/C_1) - 1}{(C_2/C_1) - e^{FV/RT}} \quad (35)$$

Para soluciones diluidas el potencial de membrana está dado por $V = m \cdot \ln(C_2/C_1)$, donde m se determina experimentalmente y depende de la membrana, el soluto, y de la temperatura (7). Llamando K al cociente m/RT , podemos reescribir la ec. 35 como:

$$\frac{P_+}{P_-} = \frac{(C_2/C_1)^{K+1} - 1}{(C_2/C_1) - (C_2/C_1)^K} \quad (36)$$

Esta expresión permite obtener la permeabilidad iónica relativa $n_p = P_-/P_+$, como función de la concentración relativa C_2/C_1 y de los valores experimentales de K . Si definimos a los números de transporte t_+ y t_- , como las fracciones de la corriente eléctrica transportada por cationes y aniones respectivamente, o sea:

$$t_i = \frac{u_i}{u_+ + u_-} \quad (37)$$

donde u_i es la movilidad iónica de la especie i -ésima. Si además utilizamos la relación entre las movilidades y las permeabilidades (7) dada por la siguiente relación:

$$u_i = \frac{A_g b P_i}{A_d RT} \quad (38)$$

donde A_g es el área geométrica de la membrana y A_d es el área de la misma susceptible a la difusión, encontramos que los números de transporte t_+ y t_- como función de C_2/C_1 y de K están dados por:

$$t_+ = \frac{1}{1 + n_p} ; \quad t_- = \frac{n_p}{1 + n_p} \quad (39)$$

La selectividad de una membrana pasiva, depende en algún grado de la complejidad estructural de la misma. Para obtener una medida cuantitativa de esta relación, es necesario evaluar el grado de complejidad de la membrana por una cantidad medible, como por ejemplo la porosidad θ , que es $\theta = A_d/A_g = r^2 N$, donde r es el radio promedio de los poros y N la densidad superficial de los mismos.

La selectividad de las membranas artificiales de lípidos es mucho menor que la de las biológicas. Probablemente esto se deba a que los mecanismos de los que depende la selectividad actúen en los poros hidrofílicos de las membranas, poros que podrían estar relacionados con las proteínas integrales en las membranas biológicas. En el siguiente capítulo presentaremos un modelo de los poros hidrofílicos producidos por ciertos antibióticos en membranas artificiales, y los cambios en la selectividad como función del tamaño y número de éstos.

PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS MEMBRANAS ARTIFICIALES

Aunque las membranas biológicas presentan una estructura compleja y variada, es posible reproducir artificialmente la bicapa de lípidos que, como se vió en el Capítulo I, es común en todas ellas. Por su similitud con las membranas naturales, las membranas artificiales permiten estudiar, bajo condiciones controladas, algunos fenómenos que ocurren en aquellas como la excitabilidad, selectividad iónica, transporte activo de iones, y efectos fotoeléctricos.

Membrana de Bicapa Lipídica:

Algunos de los compuestos que más se utilizan para la construcción de bicapas de lípidos o MBL (*membranas de bicapa lipídica*) son los lípidos cerebrales, proslípidos, fosfolípidos purificados, colesterol, surfactantes sintéticos, extractos de cloroplastos, etc. En el presente trabajo concentraremos nuestra atención a aquellas MBL hechas con colesterol ligeramente oxidado, que aunque tienen una composición distinta a la de las membranas biológicas, son fáciles de manejar y útiles para estudiar fenómenos de excitabilidad y conducción eléctrica. (Tien et. al. 1965D).

Existen varias técnicas para producir MBL; una de éstas, consiste en agregar una pequeña cantidad de una solución de lípidos en una abertura entre unos 0.1 y 0.2 mm de diámetro, practicada en una lámina delgada de material rígido y aislante que separa dos soluciones electrolíticas diluidas. Bajo condiciones favorables y debido a los factores fisicoquímicos que se expusieron en el capítulo I, después de unos minutos, la gota de lípidos se adelgaza en el centro de la abertura formando una estructura de tipo bicapa (sec. I.1); figura III.1.

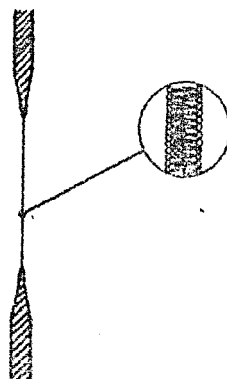


Fig. III.1 (escala $1.4 \cdot 10^6$)

Algunas de las propiedades físicas de las MBL se presentan en la tabla III.1. Comparando estas cifras con aquellas de las membranas biológicas (tabla I.1), podrá verse que las membranas artificiales constituyen un modelo aceptable de las membranas biológicas.

Tabla III.1. Propiedades físicas de las membranas artificiales (C)

espesor (A)	40 - 60
tensión interfacial (erg/cm ²)	0.2 - 6.0
permeabilidad al agua ($\times 10^{-4}$ cm/seg)	8 - 50
capacitancia (μ F/cm ²)	0.3 - 1.3
resistencia (Ω -cm ²)	10^8 - 10^9
diferencia de potencial en reposo (mV)	0 - 140
voltaje de ruptura (mV)	100 - 550

III.1 Capacidad Eléctrica de las MBL:

Las membranas naturales y artificiales presentan una capacitancia considerable, del orden de 1μ F/cm² (tablas I.2 y III.1). Aunque en menor grado que la resistencia, la capacitancia de una membrana artificial depende de la composición de las soluciones que separa, y es una cantidad fielmente reproducible.

Considerando a la membrana como un condensador de placas paralelas en el que las soluciones electrolíticas a ambos lados son las placas conductoras, podemos analizar la capacidad en términos de la concentración del electrolito, la densidad de carga de la membrana, y el potencial de membrana. Como resultado de la presencia de moléculas anfipáticas de los lípidos de la membrana, la densidad y el signo del potencial en la fase hidrofóbica dependerán de la polaridad y el número de los grupos polares. Suponiendo que cada una de las caras tiene una densidad superficial uniforme en contacto con la solución electrolítica univalente ($Ce^{±1}$) y concentración C , el potencial eléctrico presentará un perfil como el que muestra la línea continua de la figura III.9. Suponiendo que no hay electrolito dentro de la membrana, al aplicar una diferencia de potencial E entre las caras de ésta el potencial resultante en la región izquierda de la membrana se incrementará por $E/2$, mientras que en lado opuesto por $-E/2$. Dentro de la bicapa se producirá una distribución no homogénea de carga alterando el perfil del potencial en esa región como lo muestra la línea punteada de la figura III.2.

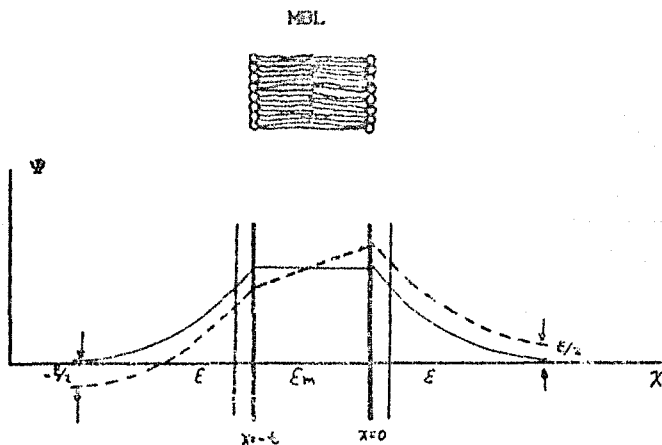


Fig. III.2

Con las consideraciones antes expuestas, la capacitancia de una MBL puede aproximarse por la suma de un término debido a la geometría de la membrana, más un término debido al electrolito que la baña, (9D). En el caso de una membrana que separa dos soluciones electrolíticas del tipo 1-1, y a concentraciones de 0.1 M, este segundo término es insignificante comparado con el geométrico, por lo que la capacitancia de la membrana bien puede calcularse según su geometría, es decir:

$$C = \frac{\epsilon m}{4\pi t} \quad (40)$$

donde ϵm es la constante dieléctrica del material intermembranal, que en una fase de cadenas largas de hidrocarburos tiene un valor de 2. Esta aproximación es aceptada universalmente (9, 12, 13D). La ec. 40 representa la capacidad específica, es decir, la capacitancia por unidad de área; sus unidades son $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, y permite medir indirectamente el grosor de la membrana t , cuando se ha determinado su capacitancia por algún método experimental.

III.2 Conductividad en las MBL:

La conductividad eléctrica transversal en las membranas artificiales es la propiedad eléctrica que se encuentra directamente relacionada con el objetivo de este trabajo. La conductividad de las MBL depende principalmente de su estructura y de la solución en la que están inmersas. Por ejemplo una MBL de colesterol en una solución al 0.001 N de NaCl presenta una resistencia del orden de $10^7 \Omega\text{-cm}^2$, mientras que en una concentración de 0.1 N del mismo electrolito, la resistencia está entre 10^3 y $10^2 \Omega\text{-cm}^2$. (Algunas hipótesis de este efecto se encuentran ampliamente discutidas en la bibliografía especializada. Mas adelante discutiremos con detalle el caso de las MBL de colesterol cuando han sido modificadas con algún antibiótico). Otro hecho característico de las MBL es que la resistencia eléctrica presenta un comportamiento óhmico cuando los voltajes aplicados se encuentran en el rango de 10 a 150 mV.

Experimentalmente, sin embargo, los resultados de las mediciones de la resistencia de una membrana a otra tienden a ser no reproducibles aún bajo las mismas condiciones. Esto puede ser debido quizás a la resistencia de fuga del borde en el soporte de la membrana, a la formación de cristales de lípidos, al efecto de ensanchamiento de la membrana, o a impurezas en ella. Sin embargo, la conductancia en una misma membrana es generalmente continua durante su tiempo de vida, que puede ser de hasta ocho horas.

Conductancia en Membranas Artificiales Modificadas:

Con el fin de modificar las propiedades intrínsecas de las MEL, se han probado contenedores de compuestos entre proteínas, enzimas, surfactantes, productos de fermentación, vitaminas, extractos de tejidos, y algunas variedades de compuestos orgánicos e inorgánicos. En particular consideraremos aquí los efectos que ciertos antibióticos tienen sobre la selectividad de iones de las MEL.

Los antibióticos usados en el estudio de las MEL se caracterizan por su capacidad para distinguir iones de propiedades químicas similares, por ejemplo Na^+ y K^+ . Estos antibióticos se dividen en el grupo de la valinomicina, el grupo de los poliósteros, el de nigericina, y el de los polienos. En particular el grupo de los polienos posee un anillo de 23 a 37 átomos, con 4 a 70 enlaces dobles conjugados en él. Estas moléculas son zwitteriones a pH neutro, pues contienen una cabeza con un grupo amino y uno carboxilo, además tienen un par de colas, una hidrofóbica de enlaces dobles de carbono y la otra con varios grupos hidroxilos. En la figura III.3 se muestran las fórmulas de las estructuras de la filipina, la nistatina y la anfotericina-B, que son algunos de los antibióticos de este grupo.

Cuando se agrega nistatina a un lado de la membrana de colesterol, después de una cierta concentración umbral y un tiempo de estabilización de aproximadamente medio minuto, la conductancia de la membrana crece exponencialmente como función de la concentración de nistatina, (fig. III.4). En estado estacionario,

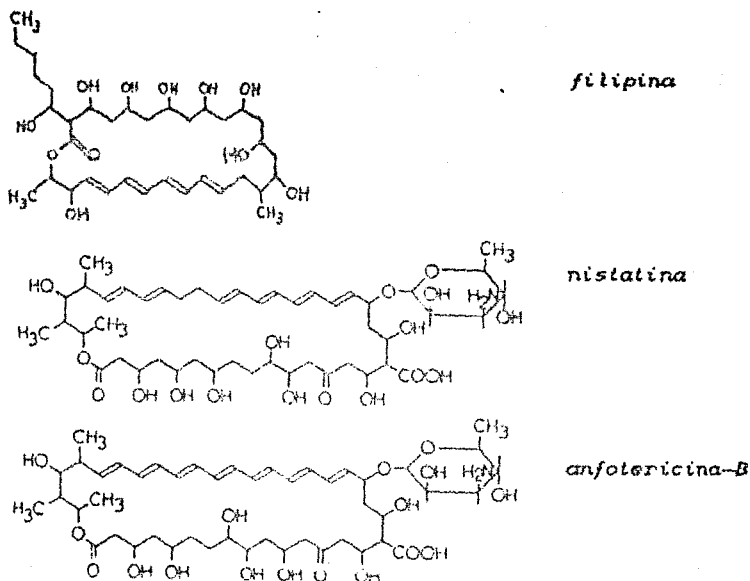


Fig. III.3: Antibióticos Polienos

la conductancia es proporcional a potencias de 4 a 12 de la concentración de nistatina. (Kleinberg y Finkelstein, 1984; ref. 12. Y M. Moreno-Bello, et. al., 1986; ref. 80).

La acción de la nistatina a un sólo lado de la membrana la hace mucho más permeable a cationes univalentes que a aniones, pero virtualmente impermeable a cationes divalentes cuando la longitud de la molécula es del orden del espesor de la membrana. Por otra parte, cuando se agrega nistatina a ambos lados de una membrana de colesterol, la respuesta es similar a la del caso anterior, excepto que la reacción ocurre en unos 400 segs. (Fig. III.4). También ocurre un incremento en la conductancia, la cual se estabiliza lentamente, aproximadamente en dos horas. En este caso, a estado estacionario, la conductancia es proporcional a

aproximadamente la cuarta potencia de la concentración de nistatina. Sin embargo, conductancias comparables a aquellas alcanzadas con al acción a un sólo lado, se logran con concentraciones mucho menores. A diferencia de las membranas tratadas a un sólo lado, las membranas tratadas a ambos lados, son selectivas a aniones, pero virtualmente impermeables a aniones divalentes.

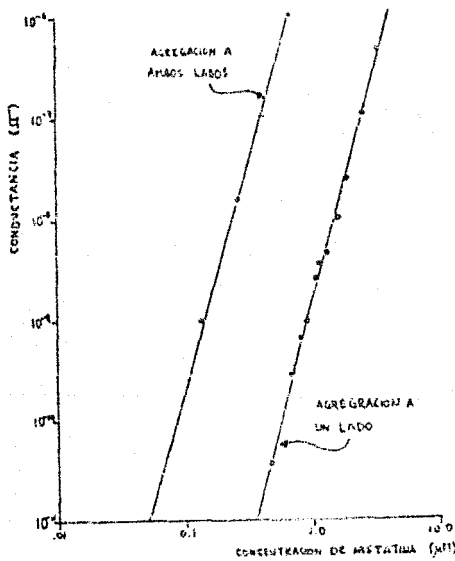


Fig. III.4

Poros Acuosos en Membranas Artificiales:

A partir de resultados experimentales se ha construido un modelo de poros conductores formados por complejos moleculares de nistatina y colesterol. Tales complejos constan de 8 moléculas de nistatina interdigitadas con el mismo número de moléculas de colesterol. (De Kruijff y Dangel, 1974; ref. 10).

Como puede verse en las figura III.3, en la molécula de nistatina, los grupos hidrofílicos se alinean a lo largo de un lado dirigidos hacia afuera de la molécula de forma anular. Sin embargo, el otro extremo del sistema anular es hidrofóbico y flexible en el punto en que no hay enlace doble conjugado. Debido a que el grupo polar micosamina y los residuos carboxílicos están localizados a un extremo de la molécula, la nistatina también presenta propiedades polares. El único grupo hidroxilo del sistema anular que no está alineado con los otros grupos hidroxilos en el extremo lejano de la molécula opuesto a los grupos cargados, está rodeado por tres grupos metilo. La sección transversal de la molécula de nistatina es casi rectangular, mientras que la sección transversal en la parte anular de la molécula de colesterol (fig.I.2) es cónica. Según este modelo, las características de las moléculas antes mencionadas, permiten la formación de un complejo nistatina-colesterol (N-C), en el que la molécula de colesterol se acomoda parcialmente en el anillo de la molécula de nistatina. En este complejo, N-C el colesterol está en contacto cercano sólo con el sistema de enlaces dobles de la nistatina, y los grupos hidrofílicos de ésta no tienen contacto directo con el colesterol.

A través de toda la membrana, los complejos N-C se forman con dos posibles orientaciones. En un caso el complejo se orientará casi paralelamente al plano de la membrana, de tal manera que la zona hidrofílica de la molécula de nistatina queda en la interface membrana-agua. En esta orientación, los complejos N-C no tenderán a agrogarse. Otra posibilidad es que el complejo N-C se oriente perpendicularmente al plano de la bicapa. En este caso, el colesterol presenta su orientación perpendicular común; pero ahora la zona hidrofílica de la nistatina en el complejo N-C, queda en el fase hidrofóbica de la bicapa. Aunque ésta es una situación energéticamente desfavorable, el lado hidrofílico de un segundo complejo N-C puede asociarse con el lado hidrofílico del primer complejo N-C para formar un complejo grande N-C-H-C, el cual queda orientado perpendicularmente a la membrana. Debido a que la molécula de colesterol puede estar presente en ambos lados del sistema de enlaces dobles de la molécula de nistatina, es posible visualizar dos complejos casi equivalentes N-C y C-N. En este

modelo, el ángulo radial del segmento del complejo $N-C$ es aproximadamente de 23° . Dicho complejo puede ser extendido a la formación de un complejo $N-C-N-C$ con un ángulo radial de 45° entre dos moléculas de nistatina (8, 10, 11). Una extensión adicional del complejo lleva a un arreglo circular de 8 unidades $N-C$, formando un complejo $(-N-C)_8$, como se muestra en la figura III.8.

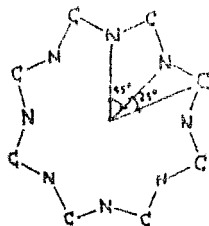


Fig. III.8

En el modelo, la orientación perpendicular a la membrana de un complejo $(-N-C)_8$, es energéticamente más favorable que la paralela, pues en la primera, los lados hidrofílicos de cada uno de los complejos $N-C$ se protegen mutuamente de la fase hidrofóbica de la bicapa (fig. III.8). Debido a un efecto cooperativo, la orientación perpendicular del complejo $(-N-C)_8$ que eventualmente resulta, queda completamente estabilizada, ya que ahora todos los sitios hidrofílicos de la molécula de nistatina están dirigidos hacia adentro del arreglo, mientras que todos los grupos hidrofóbicos lo están hacia afuera. Estos arreglos constituyen un medio poro, con un diámetro interno de aproximadamente unos 8Å, y una longitud de 20Å; (8 Å de la cabeza polar, y 22Å del sistema anular de la nistatina; Kleinberg y Finkelstein, 1968; ref. 12). La parte interior es hidrofílica, debido a los grupos hidroxílicos de la molécula de nistatina; mientras que el lado exterior es hidrofóbico debido al sistema de enlaces dobles conjugados resultantes de la interdigitación de las moléculas de nistatina y de colesterol. Dos de estos medios poros a cada lado de la membrana son necesarios para completar un poro conductor. En este caso, los grupos hidroxilos de la nistatina que no están alineados en el interior del poro, pueden ser usados para anclar los dos medios poros, estabilizando así el canal conductor.

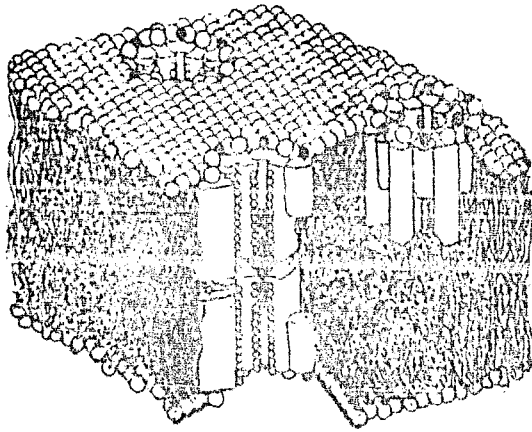
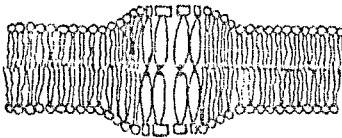
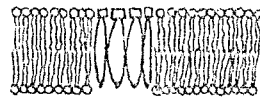


Fig. III.6 Poros acuosos formados por agregados de nistatina y colesterol en una bicapa de lípidos.

La longitud del sistema doblemente unido iguala a la de la bicapa de lípidos, (fig. III.7a). En el caso en el que la longitud de la molécula de nistatina sea del mismo orden que el grosor de la bicapa, sólo será necesario un medio canal para formar un poro conductor (fig. III.7b). Ambos tipos de canales son formados por la misma molécula, nistatina, aunque se requieren concentraciones mucho mayores para la formación de canales cortos que para canales largos.



a) dos medios poros forman un canal conductor a través de una bicapa gruesa.



b) un medio poro atraviesa una bicapa delgada.

Fig. III.7

Potencial Inducido por un ión univalente en un Canal Acuoso:

Presentaremos ahora un cálculo numérico del potencial en el eje de un poro acuoso infinito. Dicho cálculo efectuado por D.G. Levitt (1978) y refinado por P.C. Jordan (1980), se basa en el método de imágenes, considerando la carga inducida en las interfaces dieléctricas y sus singularidades en los bordes pronunciados del sistema. Se considera un poro de geometría cilíndrica de radio a_0 , y cuyo líquido interior tiene la misma constante dieléctrica ϵ que el medio de las masas acuosas, y que está embebido en una bicapa de constante dieléctrica ϵ_m y grosor L . Una carga q situada en z_0 induce densidades de carga superficial σ como se indica en la figura III.6.

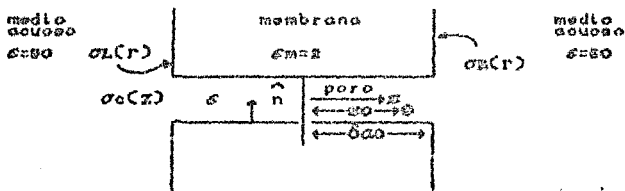


Fig. III.6

En unidades adimensionales (a_0 para las distancias, $q/\epsilon_0 a_0$ para el potencial, y $q/\epsilon_0 a_0^2$ para las densidad de carga), el problema consiste en integrar las ecuaciones:

$$\sigma(\vec{r}) = \frac{(\epsilon - \epsilon_m)}{2\epsilon(\epsilon + \epsilon_m)} \hat{n} \cdot \nabla \Phi(\vec{r}) \quad (41)$$

y:

$$\Phi(\vec{r}) = \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}_0|} + \int \frac{\sigma(\vec{r}') dS}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \quad (42)$$

en donde $\sigma(\vec{r})$ es la densidad de carga superficial, y $\Phi(\vec{r})$ es el potencial electrostático. Al integrar numéricamente las ecs. 41 y 42 para un ión en el eje del poro al centro de la membrana y con

valores típicos para $\epsilon = 80$ y $\epsilon_m = 2$, se obtiene como resultado un potencial mostrado por los puntos de la figura III.9; en donde se ha definido $\delta \equiv L/2a_0$.

Llevando a cabo un ajuste de curva, el potencial imagen puede ser representado por la función:

$$\Phi(\delta) \approx \Phi_{\infty} \left[1 - e^{-b\delta} \right] \quad (43)$$

donde Φ_{∞} es el potencial al infinito, y que para $\epsilon = 80$ y $\epsilon_m = 2$ tiene un valor de aproximadamente 13.534 .

Esta función está representada por la línea continua en la figura III.9. Como puede verse, la curva se ajusta con mayor precisión en la región para deltas menores que 10, y se toma $b = 0.131$ con el fin de optimizar el ajuste en los puntos intermedios de dicho intervalo. Es importante hacer notar que la función para el potencial representada por la ecuación 43, no es un resultado analítico de la integración de las ecs. 41 y 42, sino que es sólo el resultado de un ajuste de curva.

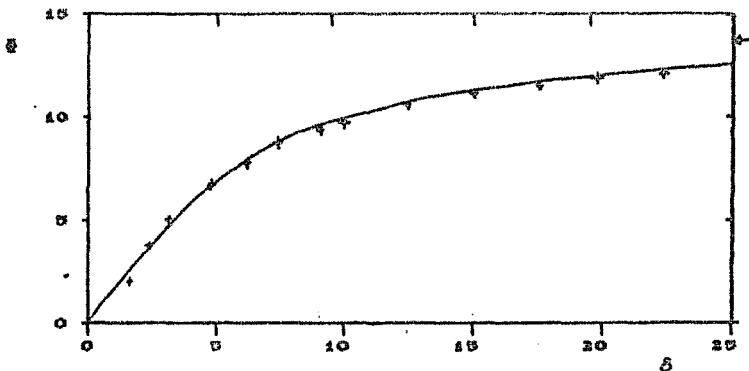


Fig. III.9: Potencial imagen en el centro de un canal cilíndrico de longitud $2\delta a_0$. Las unidades para el potencial son (Q/a_0) .

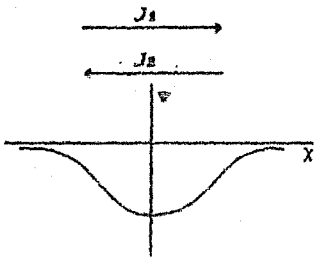
En términos de parámetros experimentales, la energía máxima en el canal es:

$$E_{\max} = \frac{q}{2d} \cdot \delta(L/d) \quad (44)$$

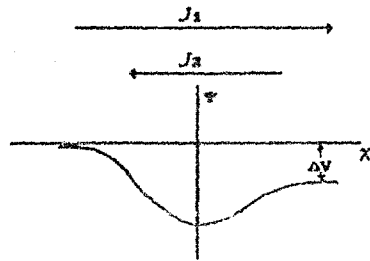
donde d es el diámetro del canal y L es el grosor de la membrana. Claramente esta energía es más sensible a la variación de d que de L .

Aplicando este modelo a canales de nistatina, tenemos para el caso de agregación a un solo lado: $\delta \approx L/d \approx 20/3 = 3.5$, según las ecuaciones 43 y 44 la barrera de energía es de 4.34 kT ; mientras que para agregación a ambos lados: $\delta \approx 35/3 = 7$, la barrera de energía sería de 7.09 kT aproximadamente. Este valor corresponde a la profundidad del pozo (barrera atractiva) de potencial inducido por un ión en el centro del canal (fig. III.10a).

Al fenómeno de inducir potenciales atractivos se le conoce como *afinidad*, y en presencia de esta los iones encuentran cierta resistencia a la difusión. Esto es debido a que el potencial atractivo tiende a retardar su movimiento. Cuando el perfil es simétrico como en la fig. III.10a, ninguno de los flujos a la derecha, J_1 , y a la izquierda, J_2 , se ve favorecido. Sin embargo, al aplicar exteriormente una diferencia de potencial ΔV , el perfil del poro se ve alterado como se muestra en la figura III.10b. En este caso el flujo de iones hacia la derecha, J_1 , se favorece observándose un flujo neto a través de la membrana. Es importante destacar que el potencial total que siente un ión en el centro de un poro, no es solamente el potencial inducido por el ión, sino que también las cargas fijas del sistema contribuyen al potencial.



a: Flujos a través de un potencial simétrico.



b: Flujos a través de un potencial alterado.

Fig. III.10 Flujo de iones a través de un pozo de potencial inducido.

Capítulo IV

IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA PARA MEDIR LA CONDUCTANCIA EN MEMBRANAS ARTIFICIALES

Presentaremos ahora algunos métodos experimentales para medir propiedades eléctricas de las membranas artificiales, concentrándonos principalmente en aquellos que sirven para medir su conductancia. Las mediciones eléctricas son los métodos más usados para caracterizar las propiedades de las BLM, y constituyen una manera sencilla de monitorear los cambios que éstas sufren bajo el efecto de ciertos modificadores.

Como se explicó en el capítulo III, la membrana artificial se forma en una pequeña abertura circular practicada en un material hidrofóbico que separa dos soluciones acuosas. Bajo circunstancias favorables, se formará una bicapa de lípidos anfipáticos que se adelgazará espontáneamente en la zona central, pero formando un anillo de lípidos alrededor del borde de la abertura como se muestra en la figura III.1, (Tieng, 1974). Debido a la pequeñez del área de la membrana, ($\approx 10^{-2}$ mm²), es común emplear una fuente de luz y un microscopio de bajo poder para observar su formación.

Las membranas artificiales pueden ser construídas de varias maneras. Una de ellas consiste en "pintar" la membrana en una abertura de 0.1 a 0.2 mm de diámetro practicada en una pared delgada de un recipiente de teflón. Este recipiente de unos 10 ml, se encuentra inmerso en una cámara exterior de igual volumen. Ambos compartimientos se llenan con una solución salina de 0.1 N. De éstos salen dos puentes de Agar saturado con KCl, que terminan en sendos recipientes, y que a su vez contienen solución salina en la que están inmersos los electrodos no polarizables. Un esquema del arreglo experimental se muestra en la Fig. IV.1.

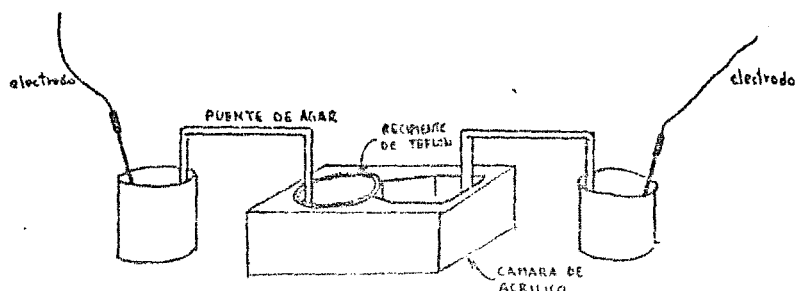


Fig. IV.1: Arreglo experimental para mediciones eléctricas en BLM.

Los lípidos se agregan con ayuda de un pincel extremadamente fino, o con la ayuda de una jeringa microlítica a la que se le ha colocado un pequeño tubo de polietileno o teflón. Debido a que la membrana intacta tiene baja conductancia, deberá tenerse extremo cuidado en aislar eléctricamente a los recipientes, electrodos, interruptores, y conexiones del sistema, para evitar fugas de corriente. Con el fin de garantizar una mezcla uniforme en los recipientes, se utiliza un agitador magnético.

Los electrodos van conectados a una serie de circuitos que —debido a la resistencia extremadamente alta de la membrana intacta—, deberán tener una resistencia no menor que $10^{10} \Omega$ con respecto al potencial base. Asimismo las películas de grasa y la atmósfera del laboratorio, pueden constituir conductores con resistencias menores que la de la membrana. En mediciones de capacitancia deberá considerarse que la capacidad debida a los electrodos, los recipientes, y en los mismos instrumentos utilizados en la medición puede fácilmente exceder la capacitancia de la misma membrana. Bajo ciertas condiciones ideales, la impedancia de salida de las señales de corriente, deberá ser mayor que diez veces la resistencia de la BLM en ambos lados de la

membrana; y de la misma manera, la impedancia de salida de los componentes de medición de voltaje deberá ser mayor que diez veces la resistencia en ambos lados de la membrana. Comúnmente para mediciones de capacitancia uno de los lados de la membrana se encuentra en un potencial base efectivo, y las impedancias de la corriente y el voltaje de salida se mantienen a altos valores únicamente en el lado no aterrizado de la membrana (6).

IV.1 Mediciones con Corriente Directa:

Capacidad Eléctrica:

Las mediciones eléctricas, tanto de la impedancia como de la capacidad de las MBL, se realizan principalmente por dos métodos: con corriente directa *CD* y con corriente alterna *CA*. Por lo que corresponde a la capacidad, puede medirse con algún método de relajación, o por un método de corriente transitoria utilizando una resistencia alta. Este último, consiste en aplicar pequeños voltajes a través de la membrana con ayuda de un circuito como el que se muestra en la figura IV.2, en donde la resistencia R_m , —que deberá ser conocida—, y el capacitor C_m representan las respectivas características de la membrana.

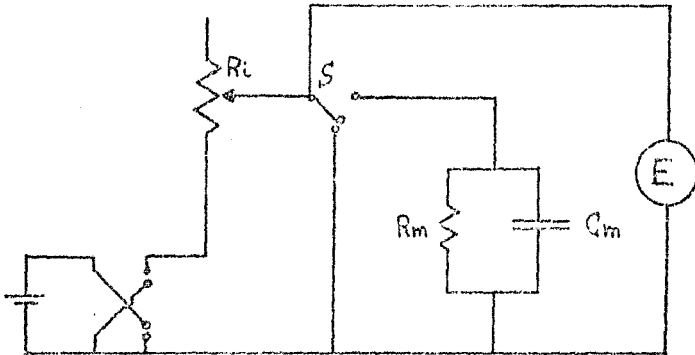


Fig. VI.2: Circuito para mediciones de capacidad.

Primero, ajustando potenciómetro R_i , se aplica un pequeño voltaje E_0 a través de la membrana hasta alcanzar el estado estacionario. En seguida se abre el interruptor S y se registra el voltaje E_t en la membrana como función del tiempo t , el cual disminuye en la forma:

$$E_t = E_0 \cdot \exp(-t/R_p C_m) \quad (45)$$

donde R_p es la resistencia de fuga dada por:

$$\frac{1}{R_p} = \frac{1}{R_m} + \frac{1}{R_i} \quad (46)$$

La capacidad C_m puede obtenerse despojandola de la ec. 45. Si t se mide cuando $E_m/E_0 = 0.37$, la ec.45 se puede escribir como: $\tau = R_p \cdot C_m$, en donde τ es la llamada constante RC. Cuando τ y R_p se conocen, C_m es fácil de calcular. La capacitancia de la membranas artificiales se expresa comunmente en $\mu F/cm^2$, y tiene valores típicos del orden de $2 \mu F/cm^2$.

Resistencia:

Usualmente la resistencia se mide sometiendo a la membrana a una pequeña diferencia de potencial, por medio de un par de electrodos reversibles. Se envía un pulso de voltaje a uno de los lados de la membrana, y se mide el resultante al otro lado. Las componentes críticas del circuito son la resistencia que limita la corriente de entrada a la membrana R_i y el circuito que mide y amplifica el voltaje de salida. La resistencia R_i deberá tener un valor por lo menos diez veces que el de la resistencia R_m ; esto es de $10^6 \Omega$ a $10^{10} \Omega$. El circuito de amplificación del voltaje de salida, —puede ser un electrómetro—, deberá tener una alta resistencia de entrada, —del orden de $10^{10} \Omega$ —, y una baja impedancia de salida para la graficadora ó un convertidor analógico-digital.

Para una membrana intacta, generalmente se obtiene una relación lineal entre la corriente y el voltaje aplicado cuando éste tiene un valor de entre 50 y 100 mV. Las unidades de los resultados experimentales de la resistencia transmembranal R_t son *ohms*, pero al dividirse por el área de la membrana A , se obtiene la resistencia normalizada R_m cuyas unidades son *ohms-cm²*. El valor normalizado R_m es el que comúnmente se reporta en la literatura. Por otra parte, la resistividad o resistencia específica de la membrana cuyas unidades son *ohms-cm*, se calcula a partir de R_m utilizando la relación $\rho = R_m/t_m$, donde t_m es el grosor de la membrana, que es de 40 a 90 Å. Una membrana intacta exhibe valores de R_m típicos de $10^9 \Omega\text{-cm}^2$ a $10^{10} \Omega\text{-cm}^2$, con resistividades correspondientes ρ_m de $10^{12} \Omega\text{-cm}$ a $10^{10} \Omega\text{-cm}$, para un grosor de 100 Å. Esta resistividad corresponde en su mayor parte a la fase de hidrocarburos de los lípidos.

Sistema Utilizado en este Trabajo:

Con el fin de controlar desde una computadora un experimento para medir resistencia en membranas artificiales, se ideó un sistema cuyo diagrama operacional se muestra en la figura IV.3.

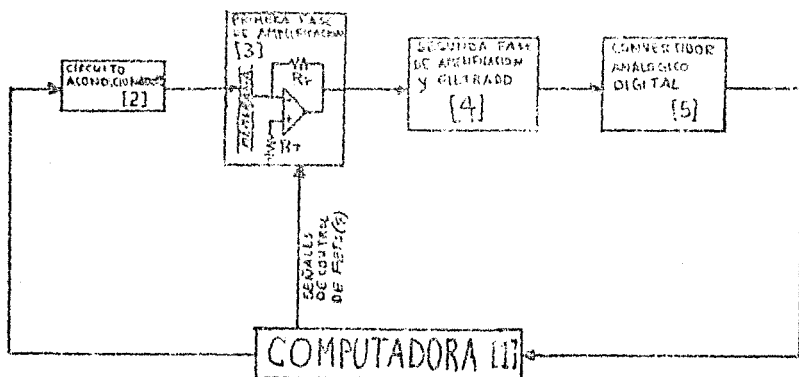


Fig. IV.3 Sistema computarizado para medir resistencias en MBI.

En general, la operación consiste en enviar desde una computadora [1] una señal de CD, a un circuito acondicionador [2]. En esta etapa la señal es acondicionada para ser enviada a la membrana, la cual forma parte de un amplificador inversor [3]. La señal resultante de esta etapa es filtrada y amplificada cien veces por un segundo circuito amplificador [4], y finalmente es enviada a un convertidor analógico/digital [5] que la traduce para que la computadora la pueda leer. En seguida presentaremos con más detalle la composición y el funcionamiento de los bloques [2], [3], y [4]. El circuito de conversión [5] y los programas para el control del experimento, se tratan en el siguiente capítulo.

Circuito Acondicionador:

Como se mencionó anteriormente, con ayuda de la computadora se generan pulsos digitales, cuya duración es controlable desde la programación. Sin embargo, este pulso no puede ser enviado directamente a la membrana debido a su alto potencial inestable, y a que introduce demasiada carga a la membrana. Es por esto, que el pulso pasa primero por un circuito acondicionador cuyo diagrama se muestra en la figura IV.4.

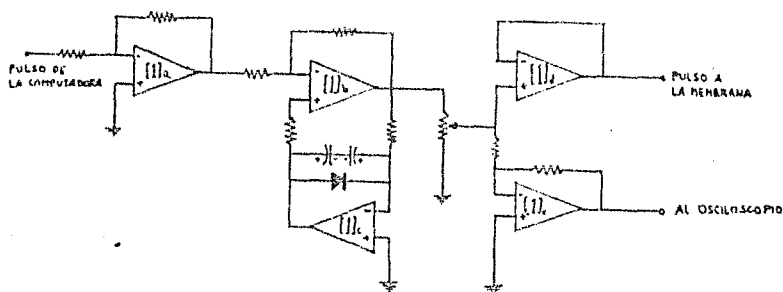


Fig. IV.4: Circuito acondicionador de pulsos.

Este circuito recibe a su entrada un pulso de malas condiciones, —generado por la computadora—, como el que se muestra en la figura IV.5a. El primer amplificador operacional del circuito, —marcado como 11a en la figura IV.4—, simplemente invierte el pulso para enviarlo al arreglo formado por el amplificador 11b conectado sobre un estabilizador de nivel de corriente directa que retiene el nivel de voltaje cero al actuar como un filtro pasa altos. En esta sección del circuito el pulso es transformado a una forma como la que se muestra en la figura IV.5b. En dicho perfil la superficie de la primera fase es igual que la de segunda, lo que garantiza que el circuito recupera la carga eléctrica que le introduce a la membrana durante la primera fase. Las medidas se registran durante la primera fase, es decir cuando el voltaje es constante y positivo; y deberá considerarse que el tiempo de esta primera fase —controlado por la computadora— no sobrepase los el tiempo de relajación del circuito con el fin de que el voltaje no empiece a decaer antes de tiempo. Con la resistencia variable que actúa como divisora de voltaje se ajusta la amplitud del pulso al valor deseado, que es de aproximadamente 40 mV, (fig. IV.5c). Finalmente el pulso se envía al seguidor de voltaje 11d, que suministra la corriente e incrementa la impedancia de salida para enviarlo a la membrana. El pulso puede ser registrado en un osciloscopio conectado a la salida del amplificador 11e.

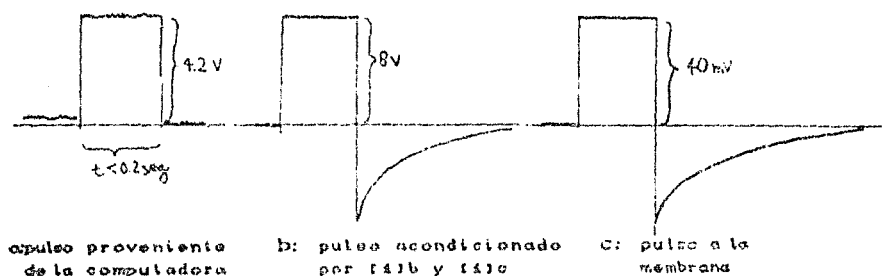


Fig. IV.5: Perfil del pulso en diversas fases del circuito acondicionador.

Primera Etapa de Amplificación:

El bloque [3] es básicamente un amplificador inversor, en el que la membrana juega el papel de resistencia de entrada. Así, si se aplica a la membrana un voltaje conocido V_e , el voltaje V_a a la salida del amplificador, estará dado por la relación:

$$V_a = - \frac{R_f}{R_m} \cdot V_e \quad (47)$$

en donde R_f y R_m son los valores de las resistencias de retroalimentación y de la membrana respectivamente.

Sin embargo, una sola membrana artificial presenta variaciones en su resistencia en el rango de 10^3 a 10^7 Ω como función de la concentración de antibiótico (Fig. III.4). Esto significa que si se utiliza una resistencia de retroalimentación constante, el voltaje V_a sufrirá cambios de hasta seis órdenes de magnitud. Debido a que la señal es leída por un convertidor de 8 bits, se tendría una resolución de aproximadamente 10^3 Ω en la resistencia de la membrana. Con el fin de eliminar este problema, se colocaron cuatro resistencias de retroalimentación conectadas en paralelo, pero de tal manera que cada una de ellas puede seleccionarse independientemente. El circuito del bloque [3], se muestra en la parte izquierda de la figura IV.6.

Como puede verse el amplificador operacional [2]a recibe por su entrada inversora al pulso proveniente de la membrana. Tiene cuatro resistencias de retroalimentación de 100, 10, 1, y 0.1 $M\Omega$. Cada una de estas resistencias puede ser seleccionada activando el transistor de efecto de campo, FET, que se encuentra a su izquierda. Estos a su vez, son controlados desde la computadora a través de un puerto de escritura de ocho bits que se conecta a las entradas no inversoras de los amplificadores [3]i, (parte superior izquierda de la figura IV.6). El amplificador [2]a, se encuentra montado sobre un arreglo que actúa como una primera fase de filtrado.

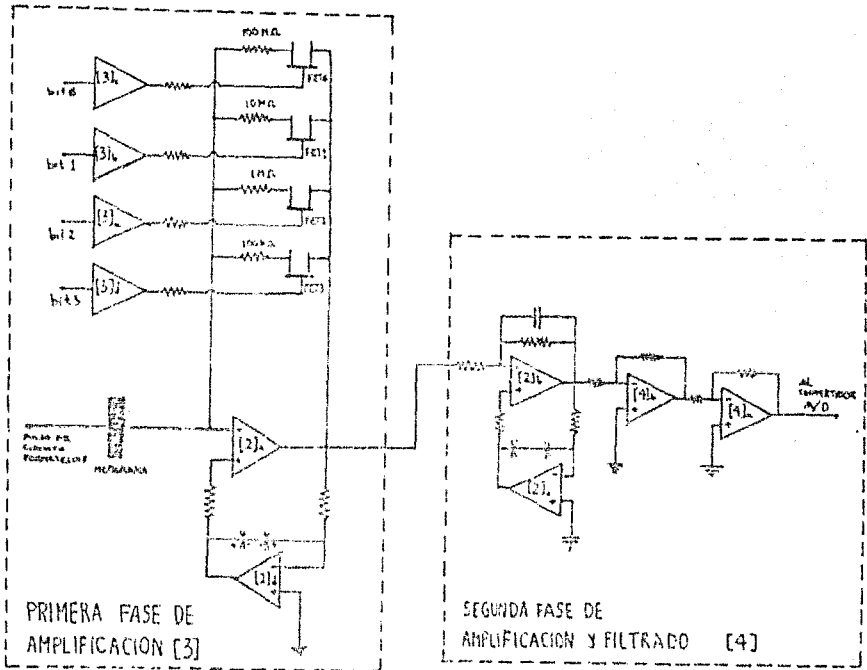


Fig. IV.6 Circuitos de amplificación y filtrado.

Segunda Etapa de Amplificación y Filtrado:

Como resultado de la primera fase de amplificación, se tiene un pulso de baja amplitud y con una componente de corriente directa debida al potencial de referencia. Con la finalidad de eliminar esta componente e incrementar la amplitud cien veces, la señal se introduce por el bloque mostrado en la parte derecha de la figura IV.6. La señal llega al amplificador [2]b conectado como integrador y montado sobre el [2]c, en donde se elimina la componente directa de la señal. Finalmente el pulso es amplificado diez veces por cada uno de los amplificadores [4]b y [4]a, y enviado directamente a la fase que realiza la conversión analógico/digital. Sobre esta fase, se trata en el capítulo V. Los diagramas técnicos de los circuitos presentados en este capítulo, aparecen en el apéndice A.

Operación del Sistema

Mencionaremos ahora algunos aspectos importantes sobre el la operación del sistema para medir resistencia en MBL, utilizado en este trabajo. A pesar de que dichos aspectos fueron obtenidos en base a pruebas experimentales con resistencias electrónicas, permiten obtener cierto grado de experiencia en la utilización del sistema. Cabe mencionar aquí, que las pruebas se realizaron controlando a los circuitos acondicionador y de amplificación y filtrado, con la interfase y los programas que se presentarán en el Capítulo V y Apéndice B respectivamente.

Primeramente consideraremos la estabilización de los circuitos formateador, amplificadores y de filtrado que se presentaron anteriormente, (Figuras IV.4, IV.6, A.1 y A.2).

Como primera observación, debemos mencionar el alto grado de dependencia de la señal de salida del circuito de amplificación y filtrado, según el voltaje de alimentación. De este valor, depende el tamaño del pulso que se envía a la membrana, y por lo tanto los factores de amplificación en cada una de las fases del sistema. Durante las pruebas, se alimentó a los circuitos, con un voltaje de ± 14.0 voltios, y se ajustó la resistencia variable del circuito formateador (fig. A.1), de tal manera que el tamaño del pulso que se envía a la membrana resulte ser de 40 mV.

Otro aspecto importante sobre la estabilización del circuito, es la presencia de un voltaje distinto de cero a la salida del circuito, aún cuando no exista una señal a la entrada del mismo. Este voltaje de salida, depende de la resistencia de la membrana, y aparece cada vez que se cambia de resistencia de retroalimentación. Su valor es del orden de milivoltios y tiende a disminuir con el tiempo a una rapidez que parece depender de la temperatura del circuito. Afortunadamente este hecho se ha corregido a través de la programación que controla el experimento, ya que tal programa —que se presentará en el apéndice B—, contiene subrutinas que detienen el proceso de medición cuando

tal voltaje sobrepasa cierto valor crítico para cada resistencia de retroalimentación. Así mismo, el muestreo de la señal de salida se efectúa restando el voltaje de base al voltaje de la señal cuando se envía un pulso a la membrana.

A la salida del circuito amplificador, se ha observado también la presencia de ruido electrónico de alta frecuencia. La amplitud de dicha señal es del orden de milivoltios, y en su mayor parte depende de factores externos, como son la presencia de aparatos eléctricos cercanos al sistema. Nuevamente aquí, es posible disminuir este efecto indeseado con ayuda de la programación. Como podrá verse en el Apéndice D, el procedimiento de muestreo del programa de control efectúa quince lecturas espaciadas por 3 mseg.; con lo que según el teorema de Nyquist (cap. V), se consigue eliminar una parte considerable del ruido, cuya frecuencia principal es de 60 Hz.

Debe tomarse la precaución de no saturar los capacitores del circuito formateador, (figs. IV.4 y A.1). Esto se consigue evitando enviarle pulsos de mas de 0.2 segs de duración. Este hecho está ya contemplado en los procedimientos de medición y muestreo del programa de control.

Otra precaución que deberá de tomarse al utilizar el sistema, es la activación de una resistencia de retroalimentación siempre de menor valor que la de la membrana; ya que de lo contrario, se tendría como consecuencia, la salida de una señal demasiado alta peligrosa para el convertidor. Nuevamente, esta posibilidad es eliminada por completo a través de la programación.

Calibración del Sistema:

A pesar de que es posible calcular teóricamente el factor de amplificación total del circuito aplicando la ec. 47 a cada fase del circuito amplificador, para mayor precisión hemos optado por obtener experimentalmente curvas de calibración resistencia v.s. Bytes(voltaje), con ayuda de resistencias conocidas tomándolas

como patrón. Dichas curvas se muestran en la figura IV.7, y fueron obtenidas con las mismas subrutinas de muestreo que utiliza el programa de control.

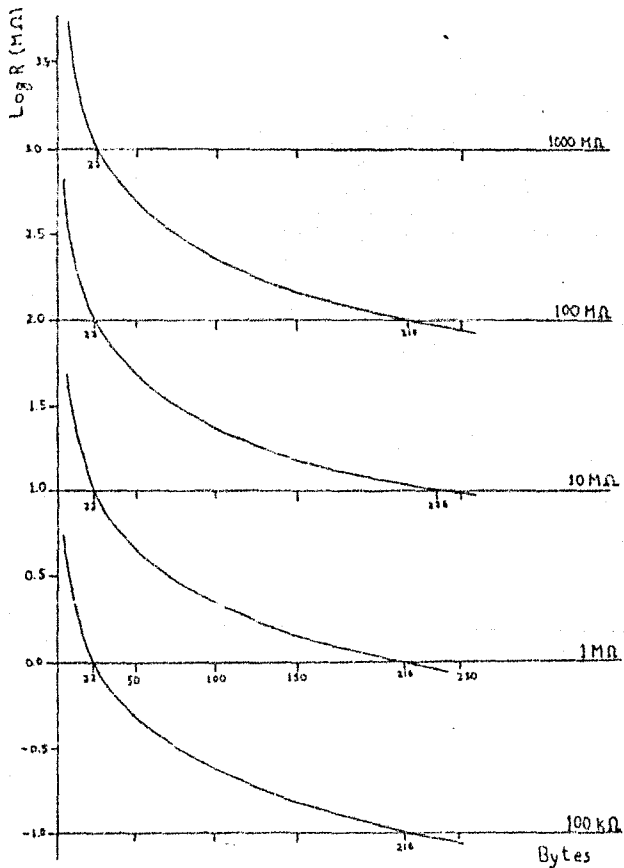


Fig. IV.7 Resistencia de la Membrana v.s. bytes a la salida del sistema.

Llevando a cabo un ajuste de curva, se obtienen relaciones de la forma:

$$R = A_i \cdot \text{Byte}^{B_i} = A_i \cdot \exp[B_i \cdot \ln(\text{Byte})] \quad (48)$$

donde R es la resistencia de la membrana en *Megohms*, cuando se registra una diferencia de *Bytes*, —que resultan de una conversión de voltaje—, al estar activada la i -ésima resistencia de retroalimentación. Los valores de las constantes A_i y B_i en la expresión 48 son:

$A_0 = 22898.09088$,	$B_0 = -1.009343$;	para la resistencia de 100 MΩ
$A_1 = 2167.118048$,	$B_1 = -0.992108$;	" " " " 10 MΩ
$A_2 = 221.540273$,	$B_2 = -1.004326$;	" " " " 1 MΩ
$A_3 = 21.688448$,	$B_3 = -1.00307$;	" " " " 0.1 MΩ

Como puede verse en la figura IV.7, la resistencia de 100 MΩ puede utilizarse para medir confiadamente resistencias de $10^9 \Omega$ a $10^8 \Omega$. Con la de 10 MΩ es posible medir resistencias de $10^7 \Omega$ a $10^6 \Omega$; y con las de 1 MΩ y 100 kΩ los intervalos de $10^5 \Omega$ a $10^7 \Omega$, y de $10^4 \Omega$ a $10^6 \Omega$ respectivamente. Por la gran variación que sufre la resistencia en la zona de voltajes pequeños, no es recomendable confiar en resultados obtenidos en esta región para la resistencia de 100 MΩ, que de otra manera nos permitiría medir resistencias de hasta $10^4 \Omega$. La ecuación 48 y estos valores, se consideran en el programa de control y captura que se presenta en el apéndice B.

AUTOMATIZACION DE LA CAPTURA DE DATOS EN LA MEDICION DE LA CONDUCTANCIA DE MBL

La adquisición o captura de datos automatizada con ayuda de una computadora, es un proceso mediante el cual las mediciones tomadas de un sistema físico son registradas y almacenadas sin la intervención directa de un operador. Además de la función de la captura, el equipo puede realizar también el almacenamiento de datos en un sistema periférico, para que puedan ser analizados y procesados posteriormente.

Hay varias razones por las es conveniente utilizar la captura automatizada de datos. Primeramente, el uso de tales equipos libera al personal de realizar tareas rutinarias y tediosas, permitiendo incrementar así el número de experimentos. Segundo, el equipo de captura de datos reduce los errores humanos tales como la transposición de dígitos que surge al registrar los datos manualmente. Y tercero, algunos de los procesos a ser medidos generan grandes cantidades de datos, lo que dificulta en gran medida su manipulación. En particular, en nuestro caso, la automatización nos permite controlar con precisión el tiempo durante el cual se hace circular una corriente a través de la membrana.

El proceso de adquisición automática de datos por computadora, involucra una serie de etapas entre el sistema físico a ser medido y la unidad central de procesamiento CPU —de la computadora—. Primeramente será necesario convertir la cantidad física a ser medida —en nuestro caso la corriente que fluye a través de la membrana—, a una señal eléctrica como puede ser una diferencia de potencial. Esta tarea la realizan los dispositivos conocidos como transductores. Generalmente esta señal eléctrica no puede ser enviada directamente a la computadora, por lo que será necesario digitalizarla con ayuda de dispositivos electrónicos conocidos como *convertidores analógico-digítales*, los que a su vez están acoplados a la computadora con ayuda de una *interfece*. (Fig. V.1).

La función que la unidad central de proceso CPU haga con los datos generados por la interfase, dependerá del software diseñado para el proceso de adquisición.

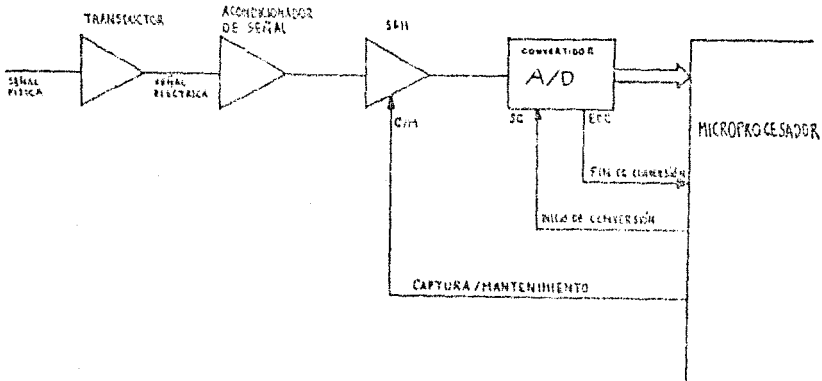


Fig. V.1: Proceso de adquisición de datos de un sistema físico por una computadora.

V.1 Muestreo de Señales:

Las señales analógicas que generalmente se obtienen de los transductores, presentan un dominio temporal y un margen de valores continuos como se muestra en la figura V.2a. Cuando esta misma señal es muestreada, se obtiene como resultado una señal de dominio temporal discreto como la que se muestra en la figura V.2b. Es decir, en el tiempo $(t_{k+1} - t_k)$, el valor de la señal es constante. La figura V.2c muestra la misma señal digitalizada, la cual presenta un dominio temporal y un margen de valores discretos.

En cada uno de los procesos que sufre la señal analógica, se pierde información debido a la discretización que se realiza. Esta pérdida de información se puede reducir haciendo el periodo de muestreo suficientemente pequeño. Sin embargo, éste queda limitado por la anchura de banda del muestreador real, o sea por el tiempo mínimo necesario para muestrear correctamente la señal.

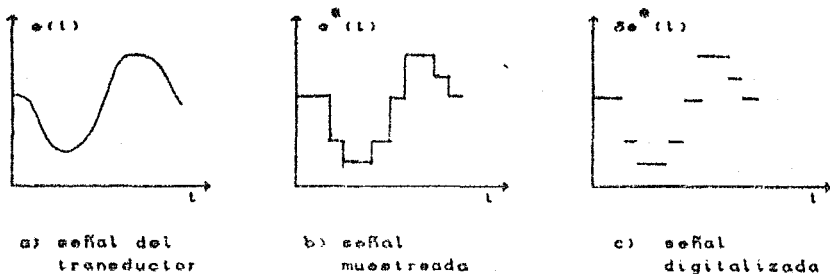


Fig. V.2

La precisión con la que se reproduce una señal dependerá de que tan rápido pueda ser muestreada; y esto depende a su vez de la velocidad de la interfase, la velocidad de la computadora, y del *software* que controla el proceso. Por lo tanto, al seleccionar una cierta interfase y desarrollar los programas de control, deberá tomarse en cuenta qué tipo de señal será muestreada. Idealmente deberá utilizarse la interfase más rápida de que se disponga, y tomar muestras a la mayor frecuencia posible. Sin embargo, estas determinaciones pueden dar como resultado un elevado costo, un excesivo tiempo de procesador dedicado al manejo de la interfase, y la producción de una gran cantidad de datos innecesarios que podrían saturar la memoria.

Con el fin de estimar cual debe ser la frecuencia ideal de muestreo, podemos considerar el hecho de que cualquier señal analógica se puede expresar en términos de una serie exponencial (o trigonométrica) en un intervalo finito. En el caso de una señal no periódica, ésta puede expresarse como la suma (integral) continua de exponenciales. Así una señal $f(t)$ como la que se muestra en la figura V.3a, puede aproximarse en base a una señal periódica, $f_T(t)$, haciendo: $\lim_{T \rightarrow \infty} f_T(t) = f(t)$

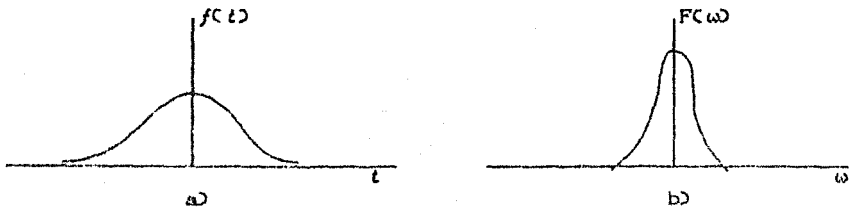


Fig. V.3

Al expresar a $f_T(t)$ en series de Fourier, se obtiene:

$$f_T(t) = \frac{1}{T} \sum_{n=-\infty}^{\infty} F(\omega_n) e^{j\omega_n t} = \frac{1}{2\pi} \sum_{n=-\infty}^{\infty} F(\omega_n) e^{j\omega_n t} \omega_n \quad (49)$$

en donde:

$$F(\omega_n) = \int_{-T/2}^{T/2} f(t) e^{-j\omega_n t} dt \quad (50)$$

Así, la ecuación 49 representa a $f_T(t)$ como una suma discreta de señales exponenciales de frecuencias $\omega_1 = \omega_0$, $\omega_2 = 2\omega_0$, $\omega_3 = 3\omega_0$, $\omega_4 = 4\omega_0$, ... $\omega_n = n\omega_0$; con $\omega_0 = 2\pi/T$. La amplitud de la frecuencia ω_n es $F_n = F(\omega_n)\omega_0/2\pi$. Al hacer $T \rightarrow \infty$, la frecuencia ω_0 se vuelve infinitesimalmente pequeña de modo que se le puede representar por $d\omega$, la suma discreta se transforma en integral, y la función $f_T(t)$ se aproximará a $f(t)$ de la forma:

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) e^{j\omega t} d\omega \quad (51)$$

en donde:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-j\omega t} dt \quad (52)$$

La ecuación 51 representa entonces a la función no periódica $f(t)$ (Fig. V.3a) en términos de la suma de funciones exponenciales con frecuencias en todo el intervalo $(-\infty, \infty)$. La amplitud de cualquier componente es proporcional $F(\omega)$. La función $F(\omega)$ es la llamada *transformada de Fourier* de la función $f(t)$, (Fig. V.3b).

Teorema de Muestreo de Nyquist:

El teorema de muestreo Nyquist plantea que, con el fin de obtener una reproducción confiable de una señal, la frecuencia de muestreo debe de ser mayor que el doble de la máxima frecuencia componente de la señal que está siendo muestreada. A esta frecuencia de muestreo, se la denominada frecuencia de Nyquist. La figura V.4 muestra el error de solapamiento producido al muestrear dos señales senoidales de frecuencias f_1 y f_2 , con un período de muestreo T_m inferior al período de muestreo máximo $T_{max} = 1/2f_2$. En los sistemas reales se suele escoger una frecuencia de muestreo (especificada en muchos casos como la correspondiente a la frecuencia a la cual el sistema puede muestrear el dato, realizar la conversión y preparar el sistema para realizar una nueva conversión) de un valor comprendido entre 8 y 10 veces superior a la máxima componente frecuencial significativa de la señal de entrada.

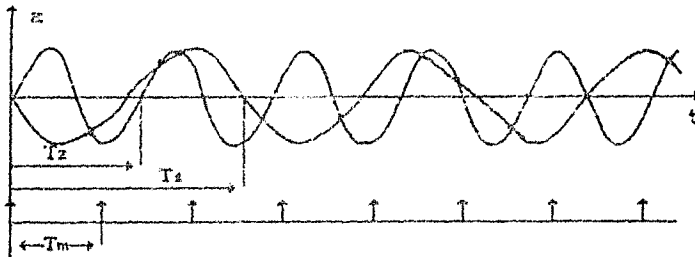


Fig. V.4: Error de solapamiento en el muestreo.

Algunas veces, sólo interesa mapear las componentes de la señal de frecuencia f_0 o menores. Sin embargo, deberán de tomarse en cuenta las componentes de frecuencia mayores que f_0 , con el fin de evitar el solapamiento.

Existen dos métodos para evitar el solapamiento. El primero consiste en muestrear la señal con la mayor frecuencia posible, aunque esto podría dar como resultado la saturación del procesador y un exceso de datos que consumen memoria. En el caso de que el sistema de adquisición no admita una frecuencia de muestreo suficientemente alta frente a una señal analógica de entrada que presente elevadas componentes frecuenciales (debidas quizás al ruido superpuesto a la señal analógica), debe recurrirse a un filtrado previo de dicha señal antes de introducirla en el muestreador, el cual, aunque no elimina totalmente las componentes de alta frecuencia, las puede atenuar lo suficiente de tal manera que resulten despreciables comparadas con la señal de interés; en nuestro sólo estamos interesados en el tamaño neto del pulso de voltaje a la salida del circuito amplificador.

V.2 Convertidores Analógico Digitales:

Un dispositivo analógico-digital A/D, es aquel que recibe una señal de entrada V_{ent} y la transforma en una palabra digital P_d , con una precisión y resolución dadas. Esto se hace generando un voltaje de referencia V_{ref} , controlado en forma digital desde la computadora, y comparándolo con el voltaje de entrada V_{ent} . Como se muestra en la figura V.8, la computadora comienza a cerrar sucesivamente una serie de llaves, hasta que el comparador detecta que el voltaje resultante de ellas, es igual al voltaje de entrada. Si este proceso se realiza automáticamente, tenemos entonces un *convertidor analógico/digital*.

En un convertidor analógico-digital ideal, la palabra digital está relacionada con la señal de entrada por la expresión:

$$P_d = \frac{V_{ent}}{V_{ref}} = \sum_{i=1}^n \frac{\delta_i}{2^i} \quad \text{con } \delta_i \in (0,1) \quad (53)$$

Por razones prácticas, en el convertidor físico, la serie se trunca a cierto número de términos; por lo que la conversión no es exacta. Sin embargo, este error puede estimarse conociendo el

* Nótese que el convertidor A/D cuenta internamente con una D/A.

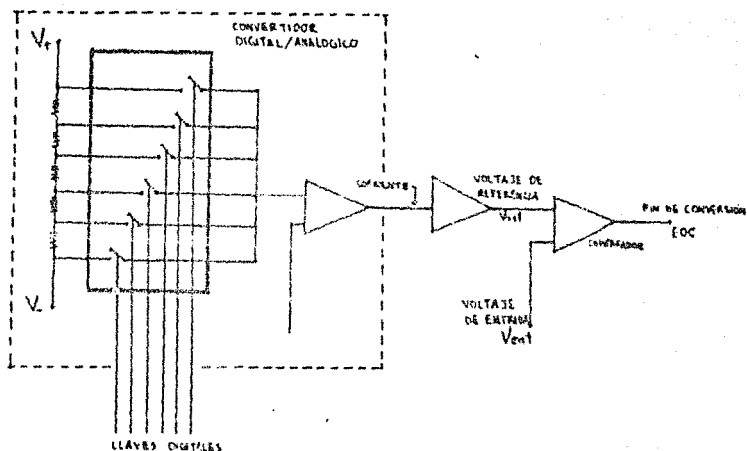


Fig. V.8 Diagrama de operación de un convertidor analógico/digital.

número de bits del convertidor. Si éste es de n bits, se realiza una cuantificación de la señal analógica de 2^n niveles, y el error máximo cometido es de la mitad de la distancia entre dos niveles, o sea:

$$E_{\max} = \frac{1}{2} \frac{V_{ref}}{2^n} \quad (84)$$

Los convertidores A/D admiten señales analógicas de entrada de voltaje de una única polaridad (0 - +V), o bipolar (-V - +V). Las características generales de los distintos tipos de convertidores dependen en gran parte de la forma en que se realiza la conversión. Una primera clasificación se puede basar en si ésta se realiza directamente o si se realiza una transformación de la señal de entrada en una variable intermedia que luego se transforma en digital.

El convertidor paralelo compara simultáneamente la señal analógica de entrada con una serie de niveles de referencia correspondientes a los valores del escalado cuantificados, utilizando por lo tanto, tantos comparadores como niveles se desee obtener. El tiempo de conversión de este tipo de convertidores es muy pequeño (del orden de nanosegundos), pero generalmente son de pocos bits y muy costosos.

Entre los convertidores que transforman la señal de entrada en una variable temporal, son los de rampa simple y los de aproximaciones sucesivas. El primero integra una tensión de referencia hasta que la rampa generada alcanza un nivel igual a la tensión de entrada. Durante este tiempo un contador cuenta los pulsos generados por un oscilador patrón. El resultado del contador es proporcional a la tensión analógica de entrada, por lo que, escogiendo adecuadamente la frecuencia del oscilador y la tensión de referencia, se obtiene directamente la salida digitalizada. Su tiempo de conversión es largo y la precisión que se obtiene depende de la precisión del voltaje de referencia y de la del reloj con el que se controla.

Por su parte, el convertidor A/D de aproximaciones sucesivas hace una optimización del tiempo de conversión mediante la realización de un algoritmo de aproximación. Utiliza un comparador, un convertidor digital-analógico y un registro de aproximaciones sucesivas SAR, (figura V.5). El algoritmo consiste en la aproximación bit por bit de la salida empezando por el bit de mayor peso MSB, que corresponde a la mitad de la máxima excursión de tensión: $V_{ref}/2 + V_{ent}$. Este bit valdrá 1 o 0 si el nivel de la señal de entrada está por encima o por debajo de este valor. A continuación se realiza la comparación de la tensión de entrada con una tensión que vale $S_1 \cdot V_{ref}/2 + V_{ref}/4$, siendo S_1 el valor obtenido en el primer bit. Se asignará a S_2 el valor uno o cero con el mismo criterio. Se sigue realizando el algoritmo de aproximación hasta llegar al bit de menor peso LSB. El número de iteraciones es igual al número de bits del convertidor. Este

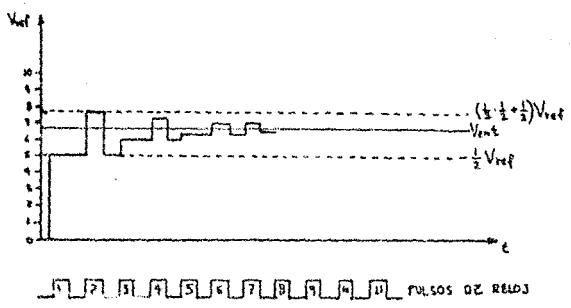
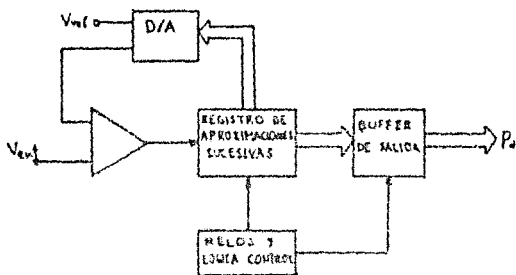


Figura V.8: Convertidor A/D de aproximaciones sucesivas.

método es conceptualmente muy sencillo, y permite realizar la conversión con rapidéz en tiempos del mismo orden que el tiempo de ciclo de los microprocesadores estándar.

Por estas razones y por su bajo precio, se ha optado por utilizar un convertidor de aproximaciones sucesivas para la captura de datos en experimentos de membranas artificiales. En la siguiente sección presentaremos la interfase que contiene a dicho convertidor.

V.3 Interfase de Conversión Analógico-Digital y Escritura Binaria:

Mostraremos ahora la interfase que permite acoplar un convertidor analógico-digital, —de ocho bits y ocho canales de entrada—, a una microcomputadora tipo PC. Esta interfase contiene también un puerto de escritura y otro de lectura digital de ocho bits.

Esquemáticamente, en la figura V.7 se presenta un diagrama a bloques de las distintas funciones de la interfase. La computadora se comunica con el mundo físico a través del bus de datos por medio de un puerto de entrada (III), de salida (IIII), o por el convertidor A/D. Con ayuda del puerto de entrada pueden leerse también las señales digitales de control que resulten de una conversión analógico/digital efectuadas por el convertidor A/D (IV). Las distintas operaciones son seleccionadas por un bloque decodificador⁸ de direcciones (II) controlado a través del bus de direcciones y de las señales de control de la computadora.

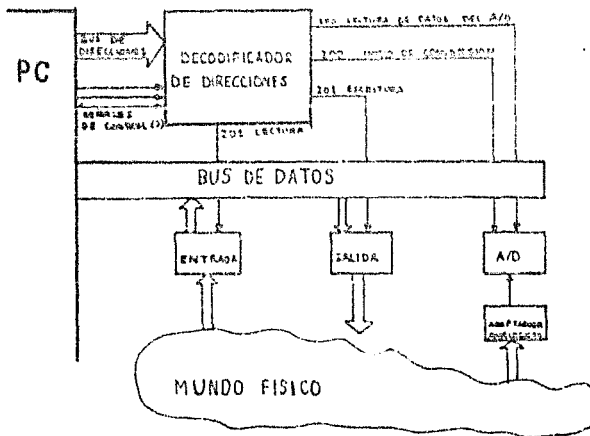


Fig. V.7: Diagrama operacional de la interfase.

⁸ Por Decodificador se entiende una matriz de elementos lógicos que selecciona uno o más canales de salida, dependiendo de la combinación de las señales de entrada presentes.

El bloque de decodificación [II] entrega una dirección específica que controla al bloque que se desee acceder, es decir, el de entrada [III], el de salida [IIII], o el de conversión A/D [IV]. Este bloque decodificador [II] es activado por las señales de direccionamiento y algunas de control tomadas directamente del bus de la computadora PC. Finalmente entrega cuatro señales de decodificación de lectura y cuatro de escritura, que son activadas cuando se realizan las operaciones de lectura y/o escritura en los puertos 200, 201, 202 y 203 respectivamente.

Específicamente, el puerto 200 en lectura, se utiliza para la lectura del dato resultante de la conversión A/D, y el 201 para la señal de fin de conversión. Estos se leen con ayuda del bloque de entrada [III]. El puerto 200 en escritura se utiliza para enviar la señal de arranque de conversión A/D, y para la selección del canal por el cual se monitoriza la señal analógica; mientras que el 201 se utiliza para activar el registro de salida digital de 8 bits. Los puertos 202 y 203, tanto en la escritura como en la lectura, se encuentran libres, es decir, no están conectados.

El bloque de entrada [III] cuenta con seis entradas que pueden ser utilizadas para verificar estados de prendido/apagado, de alguna variable del mundo físico que tenga tan sólo dos posibles valores. Sin embargo, sólo se encuentra alambrada una de ellas, que es activada por medio del programa haciendo una lectura en el puerto 201 y escogiendo el bit donde llega la señal de interés. Esta entrada, que corresponde al bit 0, es utilizada para esperar la señal de fin de conversión (EOC) que entrega el convertidor A/D.

El bloque de salida [IIII] es un arreglo de ocho registros retenedores de unos y ceros, (*flip-flops*), cuatro de los cuales son utilizados para controlar los *feils* de las resistencias de retroalimentación del circuito amplificador que se presentó en el capítulo IV (fig. IV.6). El otro registro es utilizado para enviar un pulso al circuito acondicionador (fig. IV.4).

El convertidor A/D [IV] requiere para su funcionamiento de seis señales de control, tres de las cuales se utilizan para direccionar el canal de conversión (A_a , A_b , y A_c), una para el control de la carga de dichas señales (ALC), otra para el arranque

de conversión (SC), y la última para el control de salida (OC). Estas señales se envían desde el decodificador [I] como señales de escritura. Así mismo, del convertidor A/D es necesario leer nueve señales, una de las cuales indica el fin de la conversión, y las ocho restantes corresponden a cada uno de los bits resultantes de la digitalización de la señal analógica muestreada. Estas señales se envían desde el decodificador [II] como señales de lectura.

Teoría de Operación:

El diagrama de conexiones de los distintos componentes electrónicos de la interfase, se muestra en la figura V.6. La interfase se conecta a algunas de las ranuras de expansión de una computadora PC, en donde decodifica las direcciones de control para periféricos en el rango de 200H a 377H.

Como puede verse en la figura V.8, el bloque de decodificación [II], está constituido por compuertas lógicas [F] y [G], y dos decodificadores señalados como [B] y [C] en la figura V.7. El primero, [B], decodifica con las señales A_6, A_5, A_4, A_3, A_2 y A_1 . Por condiciones de trabajo, en sus entradas G_1, G_2 y G_3 necesita los estados lógicos 1, 0, y 0 respectivamente. Estas señales se fijan con A_6, A_5 y A_4 respectivamente. De esta manera, quedan libres las entradas A, B y C para seleccionar cualquiera de las ocho posibles salidas. Por ejemplo si $[ABC] = [010]$, se activa la señal de control relacionada con este número binario, o sea la salida 12. Así, con las tres señales A_6, A_5 y A_4 , es fácil ubicar el sistema en el rango de localidades que va de 200H a 370H. El segundo, [C], decodifica con las señales A_3, A_2, A_1 y A_0 , dos grupos de cuatro puertos cada uno, siendo uno de escritura y otro de lectura.

Para el control de los decodificadores se utilizan las señales:

IOW comando de escritura a periférico

IOR comando de lectura a periférico

AEN comando de DMA, esta en alto cuando el controlador de Acceso Directo a Memoria tiene el control del Bus.

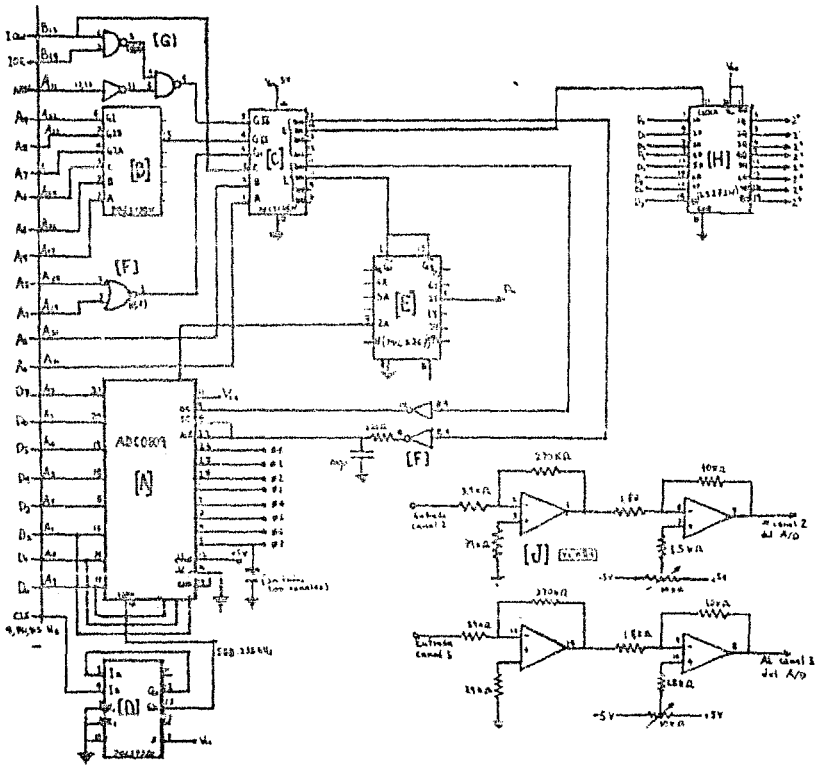


Figura V.8: Interfase del convertidor A/D y del puerto de escritura de 8 bits.

Escritura y Lectura:

Para las operaciones de lectura, los puertos se encuentran dispuestos de la siguiente manera:

Puerto 200: arranque de conversión y selección de canal.
Puerto 201: registro de salida digital de 8 bits.
Puerto 202: libre.
Puerto 203: libre.

Mientras que los de lectura quedan como:

Puerto 200: lectura del dato de la conversión A/D.
Puerto 201: lectura de la señal de fin de conversión EOC.
Puerto 202: libre.
Puerto 203: libre.

Para escribir un registro digital por el bloque [H], simplemente se considera el dato a ser escrito y se envía una señal de escritura al puerto 201.

Los decodificadores [B] y [C] son de la serie 74LS138N, y las compuertas [E] y [G] son 7402N y 74LS001B respectivamente. El circuito de escritura digital [H], es de la serie 74LS273N.

Convertidor A/D:

El convertidor analógico-digital, señalado como [A] en la Fig V.8, es de la serie ADC0809. Es un dispositivo monolítico tipo CMOS que internamente cuenta con un multiplexor de ocho canales. Es un convertidor A/D de aproximaciones sucesivas de ocho bits, con una velocidad de conversión de 100 μ s, y de lógica compatible con microprocesadores. El multiplexor es controlado por un circuito retenedor interno de tres bits con el cual son seleccionados cualquiera de los ocho canales, cada uno de los cuales es controlado por un interruptor análogo conectado directamente al comparador. El funcionamiento del convertidor ADC0809 implica una secuencia de eventos, según se muestra en la figura V.9.

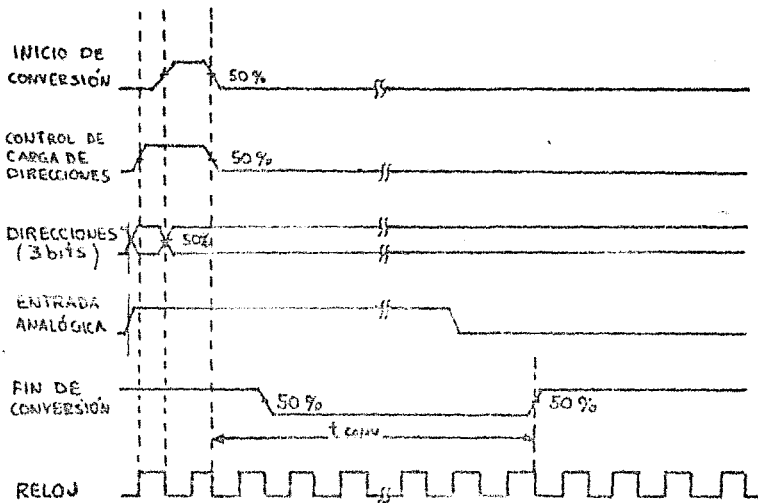


Fig. V.9: Secuencia de operación del convertidor ADC0808.

Para realizar la conversión de una señal analógica a una digital, se toma una dirección del canal analógico, de 0 a 7. En seguida se genera la señal de escritura al puerto 200 el cual carga la dirección del canal y arranca la conversión. Con ayuda del puerto 201 puede leerse en la salida ADC cuando ha finalizado la conversión. Es entonces cuando puede leerse el resultado de la conversión a través del puerto 200 del bloque de entrada, de donde la información pasa a la computadora a través del bus de datos.

La señal de reloj requerida por el convertidor, es suministrada por el contador (D) (74LS393), el cual transforma la frecuencia de la computadora, 4,781,905 Hz, a 588,233,000 Hz.

La interfase cuenta con dos adaptadores analógicos (J) conectados a los canales 2 y 3 del convertidor. Estos sirven para amplificar y ajustar a cero señales analógicas de voltajes pequeños a fin de introducirlos a los canales 2 y 3 del convertidor A/D. Los amplificadores son de la serie 11094.

El convertidor transforma señales analógicas de 0 a 5 volts, entregando un byte como función del Voltaje (en volts), según la relación:

$$\text{byte} = \frac{5}{255} \text{ Voltaje} \quad (55)$$

Mande con Software:

Una posible forma de efectuar y controlar una conversión A/D con lenguaje Turbo Pascal, es definiendo una función de argumento del tipo *Byte* de la siguiente manera:

```

FUNCTION Convertir(Canal:0..7) : BYTE;
  VAR
    Estado: BYTE;
  BEGIN
    PORT [200] := Canal; {Por el puerto 200 se asigna el
                          canal y se arranca la conversión}
    WHILE (PORT[201] AND 1) = 0 DO; { por el puerto 201 se
                                     pregunta cuando ha
                                     finalizado la conv }
      Convertir:=PORT[200]; {se lee el resultado de la
                             conversión en el puerto 200}
    END;
  
```

Por otra parte, cuando se desea escribir con el puerto de escritura [1] (74LS273), simplemente se considera el dato a ser escrito y se ejecuta una instrucción de escritura al puerto 201.

En lenguaje Turbo Pascal, la instrucción de escritura sería:

```
PORT [201] := dato;
```

donde dato = 0, 1,.....255.

Estas instrucciones podrán utilizarse en los programas de captura, así como para enviar el pulso y activar las distintas resistencias de retroalimentación del circuito amplificador. En particular, actualmente los circuitos antes mencionados se

encuentran conectados con la interfase de la siguiente manera:

PORTI\$2011:= 128;	Para enviar el pulso.
PORTI\$2011:= 1;	Para activar la resistencia de 100 MΩ.
PORTI\$2011:= 2;	Para activar la resistencia de 10 MΩ.
PORTI\$2011:= 4;	Para activar la resistencia de 1 MΩ.
PORTI\$2011:= 8;	Para activar la resistencia de 100 KΩ.

Si se desea enviar un pulso mientras se mantiene activada una de la resistencias, simplemente se suman ambos datos. Por ejemplo, si se tiene activada la resistencia de 10 MΩ (PORTI\$2011:= 2; Des puede enviar el pulso escribiendo PORTI\$2011:= 2 + 128; y después apagarlo escribiendo nuevamente PORTI\$2011:= 2; , lo que mantiene a la resistencia de 10 MΩ todavía activada.

Apéndice A: Diagramas Técnicos de los Circuitos Electrónicos

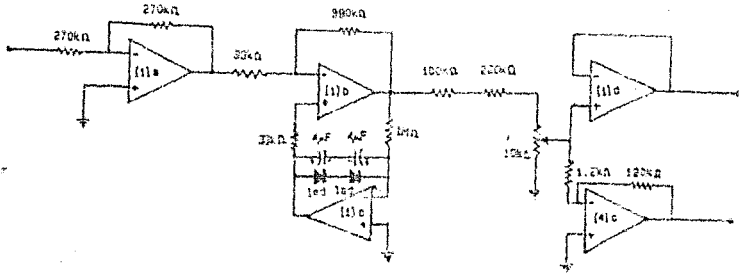


Fig. B.1 Circuito Formateador de Pulsos.⁸⁵

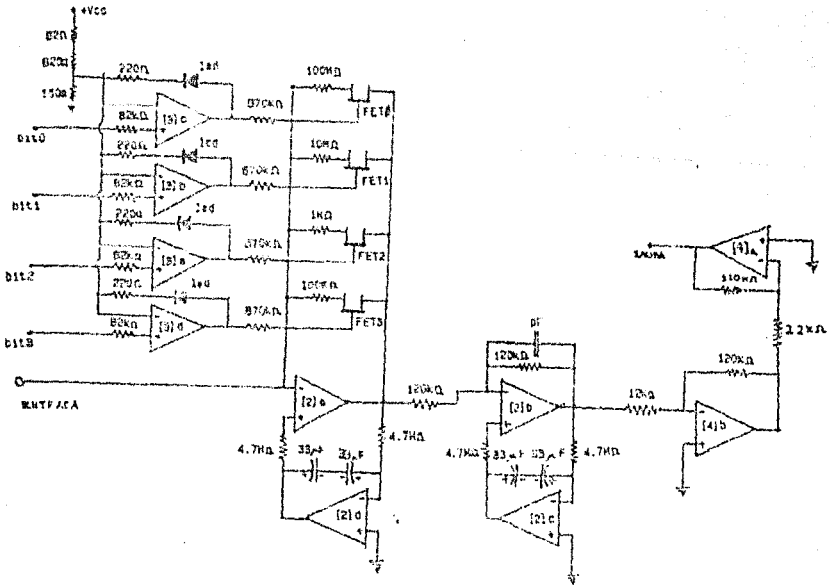


Fig. B.2 Circuitos de Amplificación y Filtrado.⁸⁵

* Todos los amplificadores operacionales son de la serie TL084, que tienen una impedancia de entrada de 10^{12} ohms.

Apéndice B

Programas de Control y Procesamiento

Presentaremos ahora el software desarrollado para el presente trabajo. El primer programa tiene como función el control de los circuitos que se presentaron en el Capítulo IV, así como la adquisición de datos del experimento. El segundo sirve para procesar los datos de los experimentos de membranas artificiales, llevando a cabo un análisis de regresión y almacenando en un archivo los resultados de dichos análisis.

Ambos programas fueron hechos en lenguaje Turbo Pascal 3, para ser utilizados en computadoras tipo PC. Para el programa de control del experimento, la computadora deberá contener a la interfase que se mostró en el Capítulo V.

B.1 Control del Experimento:

Este programa para control y captura, realiza cuatro funciones básicas, de acuerdo a la naturaleza específica de los experimentos de membranas, y a la operación de los circuitos acondicionador y amplificador utilizados en este trabajo. La primera de tales funciones es la generación de pulsos de voltaje, —de duración y frecuencia determinadas—, que son enviados al circuito acondicionador (fig. IV.4), a través del Puerto 201 de la interfase de conversión A/D (fig. V.8). La segunda es la activación automática de la resistencia de retroalimentación que corresponda a la impedancia que presente la membrana en un momento determinado (véase cap. IV para mayor claridad). La tercera función es el muestreo y conversión de la señal de voltaje a la salida del circuito amplificador. Y por último, el almacenamiento en disco de los resultados del muestreo.

Estas funciones básicas son manejadas por el programa a lo largo de todo el experimento, el cual consiste fundamentalmente en enviar a la membrana una serie de pulsos de voltaje una vez que se ha incrementado la concentración del antibiótico. Dichos pulsos, que van espaciados por intervalos de tiempo seleccionados por el

investigador, se amplifican, se muestrean, y se interrumpen, una vez que el resultado de dos o más de ellos, no varíe en una cierta proporción. Es entonces cuando se considera que la resistencia de la membrana se ha estabilizado para una cierta concentración de antibiótico, y se procede a almacenar el par (concentración, resistencial) en el archivo del disco. El mismo ciclo se repite cada vez que se incrementa la concentración, hasta que la resistencia de la membrana quede fuera de la capacidad del sistema o cuando el operador así lo desee.

A continuación se muestra un esquema del programa de control.

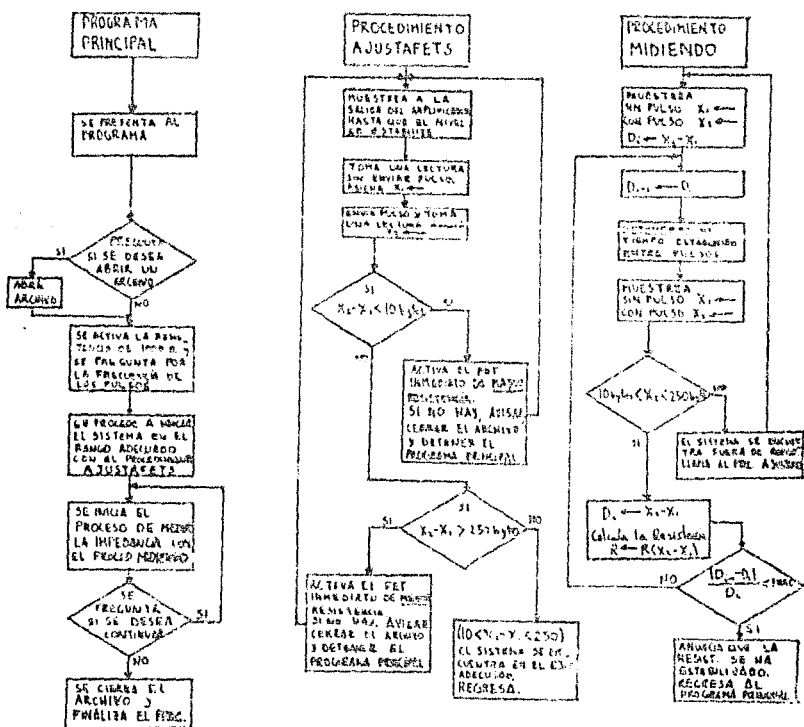


Fig. B.1 Diagrama del programa que controla el experimento.

El programa se invoca con el mensaje A)EXPERIMENTO <ret>. En la pantalla aparecerá el siguiente desplegado:

PROGRAMA PARA MONITOREAR IMPEDANCIAS EN MEMBRANAS ARTIFICIALES.

Desen guardar los resultados en un archivo? E/N

En caso de contestar afirmativamente, el programa preguntará el nombre del archivo en el que se guardarán los resultados, de la siguiente manera:

El archivo consta de cuatro columnas:

Concentración, Resistencia, Temperatura, y pH.

De el nombre del archivo. (D:nombre.DAT) (Puede ser la fecha)

En seguida, o si se contestó negativamente a la primera pregunta, el programa activará la resistencia de retroalimentación de 100 k Ω para evitar que el convertidor reciba un voltaje demasiado alto en caso de que la membrana este rota. Después desplegará el siguiente mensaje:

Intervalo Temporal entre los Pulsos? (seg.) --

Coleque la membrana y encienda la tableta.

Oprima cualquier tecla cuando este listo.....

Ahora el programa comenzará a situar al circuito en el rango adecuado. Es decir, elige la resistencia de retroalimentación correspondiente a la impedancia que presente la membrana en ese momento. Sin embargo, cada vez que se cambia de resistencia de retroalimentación, el programa revisa que el nivel de voltaje de

referencia se estabilize. El desplegado de este proceso es el siguiente:

Ajustando el sistema.	Probando con FATS.
Espere a que el nivel se estabiliza, y el programa continúe automáticamente. (Si el circuito está frío puede tardar hasta 5 minutos.) Si ni desea esperar, oprima F10 durante 5 segs.	
Checando nivel tierra:	107 mV

Si se decide no esperar, el programa tratará de elegir la resistencia de retroalimentación adecuada aún cuando el sistema no se encuentre completamente estable. Esto no es recomendable si se desea una buena precisión en los resultados. Sin embargo, su uso es conveniente, si el investigador sabe que la resistencia de la membrana se encuentra en un rango dos o tres veces alejado de rango en el que el sistema está buscando en ese momento.

Quando el programa ha localizado el rango adecuado, lo comunicará al investigador en la forma:

La resistencia está en el rango de 10 a 100 Megohms.

Ahora el programa pregunta por el valor de la concentración del antibiótico, el pH, y la temperatura, correspondientes a la resistencia que medirá:

Concentracion ?	00	---
Temperatura ?	--	
pH ?	--	

En seguida se comienza a enviar una serie de pulsos de voltaje. Con el convertidor A/D se toman muestras del voltaje antes y durante cada pulso, calculandose la diferencia (Dif). Cuando se obtiene que $|Dif_i - Dif_{i-1}| / Dif_i < \text{Prec.}$ —donde prec es una

constante cuyo valor se puede cambiar en el bloque de constantes del programa—, se considera que la resistencia se ha estabilizado y el programa, —si se abrió un archivo—, procede a escribir los valores del las variables en él.⁴ Este proceso es anunciado de la siguiente manera:

```
Midiendo
x1=2 x2=111 dif= 108 Resistencia: 20.790 Megohms.
x1=4 x2=111 dif= 107 Resistencia: 21.911 Megohms.
x1=4 x2=111 dif= 107 Resistencia: 21.911 Megohms.

La resistencia se ha estabilizado en 21.911 Megohms.

Guardando resultados en el archivo eobr122.dat

Desea Continuar ? (Y/N)
```

Si se desea continuar, el programa regresará al punto en el que se pregunta por los nuevos valores de las variables para la siguiente medición, hasta que la resistencia de la membrana quede fuera de la capacidad del sistema, o cuando el investigador así lo decida. En el primer caso, la computadora lo comunicará a través de la pantalla, y procederá a cerrar el archivo (si lo hay). En el segundo caso, simplemente se ejecuta esta última tarea.

⁴ Es importante destacar aquí que si el valor de la resistencia de la membrana cambia de un rango a otro durante el procedimiento de medición, el programa situará automáticamente al sistema y continuará con el proceso de medición.

B.2 Procesamiento de los Datos Experimentales:

Este programa se escribió en base al comportamiento típico que presenta la resistencia como función de la concentración de antibiótico (fig. B.2), en un experimento de MBL. (véase también fig. III.4). Las tareas principales de el programa de procesamiento son: 1.-la lectura y despliegue de un archivo de datos resultantes de un experimento. 2.-el despliegue de la gráfica $\text{Log}(R)$ v.s. $\text{Log}(C)$ ajustando simultáneamente una recta y desplegando sus parámetros, a partir de alguno de los puntos seleccionado por el investigador. 3.-la creación y lectura de archivos en los que se guardan los resultados del análisis de regresión para todos los puntos de la gráfica $\text{Log}(R)$ v.s. $\text{Log}(C)$, (fig.B.2), y 4.- la creación de archivos de datos a través del teclado, con el fin de poder procesar y desplegar resultados obtenidos de experimentos no automatizados. La figura B.3 muestra el diagrama del programa de procesamiento.

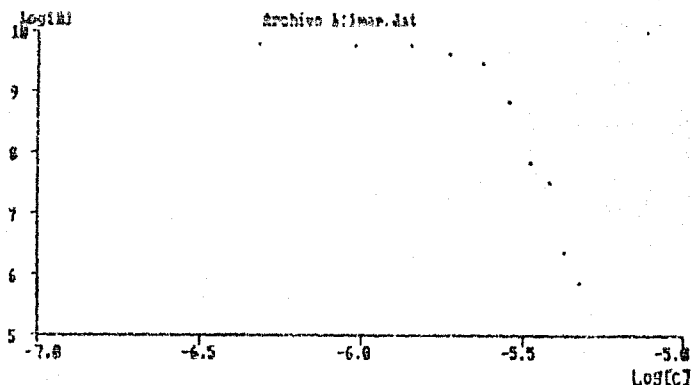
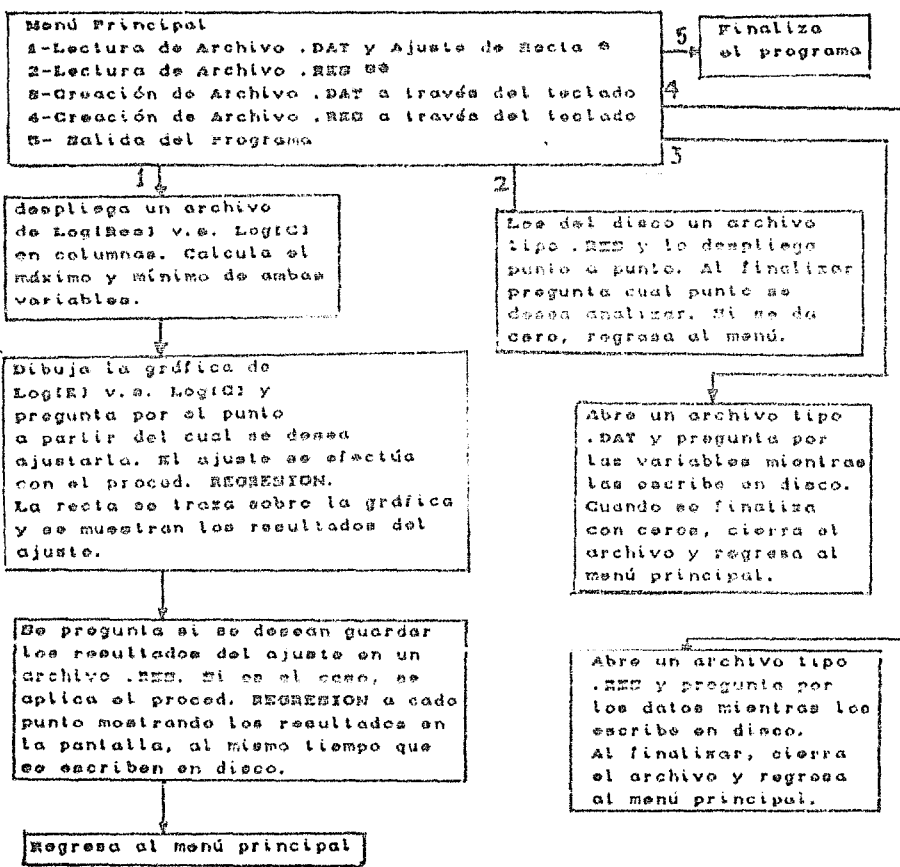


Fig. .2 Comportamiento típico de las variables en un experimento de MBL.



* Los archivos tipo .DAT constan de tetradas de concentración, Resistencia, temperatura y pH.

** Los archivos tipo .RES constan de registros de número del punto, concentración y resistencia de dicho punto, pendiente de la recta, ordenada al origen, coeficiente de correlación, y número de puntos con los que fué ajustada dicha recta.

Fig. B.3 Diagrama del programa de procesamiento de datos.

El programa se invoca con el mensaje A)MEMBRANA <ret>. En seguida se presentará su menú principal:

PROGRAMA PARA PROCESAR RESULTADOS DE EXPERIMENTOS
EN MEMBRANAS ARTIFICIALES.

1. - Lectura de un archivo tipo .DAT y ajuste de recta.
2. - Lectura de un archivo tipo .RES
3. - Creación de un archivo tipo .DAT a través del teclado.
4. - Creación de un archivo tipo .RES a través del teclado.
5. - Salida del Programa.

Elección ?

En la primera opción, el programa lee del disco un archivo de tetradas: Concentración, Resistencia, Temperatura y pH, resultados de un experimento particular de MBL. Se pregunta por el nombre del archivo (generalmente con extensión .DAT). Por ejemplo, si se quiere leer el archivo 1MAR.DAT del disco en b:

Este Programa lee los archivos generados por Hidrosa.
Despliega la gráfica de LogR v.s. LogC , y ajusta una
recta a esos puntos.

Nombre del archivo a procesar ? <D:nombre.DAT> b:1mar.dat
El archivo b:1mar.dat consta de 10 tetradas

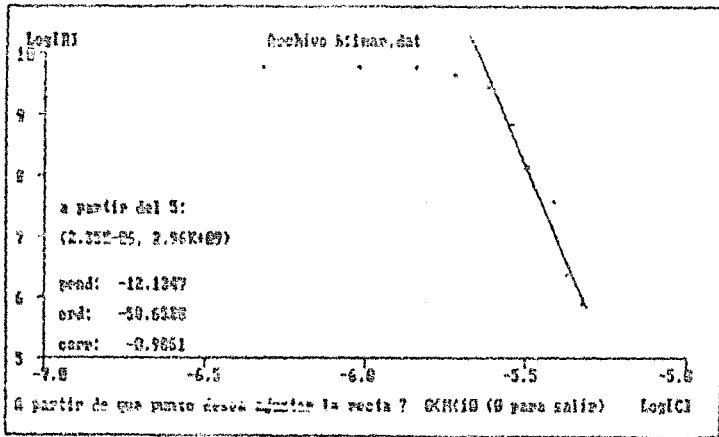
Deben verla ? S/N

Si se contesta afirmativamente, el programa desplegará el archivo en forma de columnas. Al oprimir cualquier tecla el programa buscará los valores máximo y mínimo de ambas variables, con el fin de presentar una gráfica a escala adecuada. Estos valores son desplegados en la forma:

La Concentración Máxima es: 4.7000E-05 M
La Concentración Mínima es: 4.7000E-07 M

La Resistencia Máxima es: 5.9100E+09 ohms
La Resistencia Mínima es: 7.5300E+03 ohms

Al oprimir cualquier tecla, se desplegará la gráfica Log(R) v.s Log(C), al mismo tiempo que se pregunta por el número del punto a partir del cual se desea ajustar una recta. El programa trazará sobre la gráfica dicha recta, al mismo tiempo que presentará los resultados de dicho ajuste; es decir, la pendiente, la ordenada al origen, y el coeficiente de correlación:



Para salir del procedimiento anterior, se dá un cero, y entonces el programa preguntará si se desea abrir un archivo para escribir los parámetros de la rectas ajustadas a partir de cada uno de los puntos de la gráfica. Si se contesta afirmativamente, el programa abrirá el archivo con extensión .RES, y procederá a ajustar las rectas a partir del primer punto hasta el penúltimo. Durante este proceso, mostrará en la pantalla los resultados que vá obteniendo para cada punto, cerrando el archivo al terminar para regresar el menú principal.

En la opción (2) del menú principal, se lee un archivo tipo .RES generado por la opción (1). Primeramente se pregunta por el nombre del archivo, y se despliega para cada punto en la misma forma como cuando fué generado. Al terminar este proceso, se presentará el siguiente desplegado:

```
Resultados del archivo b:imer.dat:

A partir del punto: 5
Concentracion: 8.78E+06 M
Resistencia: 8.78E+07 ohms
Pendiente de la recta: -17.0119
Ordenada: -53.0674
Correlacion: -0.9723
Ajustada con 8 puntos.
Temperatura: 70.00
pH: 7.00

Numero de punto que desea ver ?, ( 0000, 0 para salir )
```

Con esto puede seleccionarse cualquier punto que se quiera estudiar, hasta salirse al menú principal con un cero.

Las opciones 3 y 4 del menú principal sirven para ingresar archivos de tipo .DAT y .RES a través del teclado. Ambas son sencillas de manejar, pues el programa va preguntando por cada uno de los valores de las entradas de los registros.

Es importante destacar que se pueden obtener impresiones de cualquiera de los desplegados de ambos programas, simplemente oprimiendo las teclas [shift]+[PrtSc].

A continuación, se anexan los listados de los programas de control y procesamiento, en los que aparecen comentarios en cada una de las funciones y procedimientos, de los cuales es fácil extraer una idea bastante clara y detallada de todos los aspectos de los programas.

Listado del Programa de Control MIDERES, PAS:

PROGRAM MIDERES; (Mide resistencias ajustando los fet's, y abre el archivo en donde guarda los resultados)

CONST

A0=22076.09682; B0=-1.009363;
A1=2167.110048; B1=-0.992105;
A2=221.546273; B2=-1.004322;
A3=21.965445; B3=-1.00267;

LARGO=4; (casal por el que se monitoriza)
Prec=SE=0.3; (precision con la que se compara la resistencia para considerarse estabilizada)

TYPE

fetype=1..8; (fet0=1, fet1=2, fet2=4, fet3=8)

Tetradas = RECORD

Concentracion, Resistencia, Temperatura, pH: Real;

END;

Nombre = String[14];

Var

Archivo : File of Tetradas;

ArchivKey: Tetradas;

Archivnoeb: String[14];

card1, cardY, Inst, Vent, I, J: Integer;
x1, x2, Difant, Bif, Bolt, ResultaResist: Real;
Fet: fetype;
respi: char;
HayArchivo, Salgo: Boolean;
freci: Real;

{.....}

FUNCTION ExistifileName: Boolean;

(esta funcion busca el archivo en el disco.
Resulta "False" si no hay un archivo con el nombre en su argumento, evitando que el programa se aborte)

VAR

File: File;

Begin

Assign(File, FileName);

{01-}

Reset(File);

{01-}

Exist := (IOresult = 0)

End;

```
PROCEDURE CreaArchivo; (este procedimiento crea el archivo en el que se
escribieran los resultados, cuidando que no exista
ya un archivo con el mismo nombre)
```

```
BEGIN
```

```
ClrScr; GotoY(1,3);
```

```
WRITELN('El archivo consta de cuatro columnas:'); WRITELN;
```

```
WRITELN('          Concentracion, Resistencia, Temperatura, y pH.');
```

```
REPEAT
```

```
  GotoY(1,10);
```

```
  Write('De el nombre del archivo. (Dinombre.NA)');
```

```
  WriteLn (' (Puede ser la fecha)'); GotoY(1,12); ClrEol;
```

```
  ReadLn(Archivnoab);
```

```
  IF Exist(Archivnoab) THEN FOR I:=1 TO 3 DO
```

```
    Begin
```

```
      GotoY(1,15);
```

```
      Write('Existe ya un Archivo con ese Nombre.');
```

```
      Delay(500); GotoY(1,15); ClrEol; Delay(300);
```

```
    End;
```

```
UNTIL not Exist(Archivnoab);
```

```
Assign( Archivo, Archivnoab);
```

```
Rewrite(Archivo); GotoY(1,20);
```

```
FOR I:=1 TO 3 DO
```

```
  Begin
```

```
    WRITE('Archivo ',Archivnoab, ' abierto.');
```

```
    DELAY(500); GotoY(1,WhereY); ClrEol; DELAY(300);
```

```
  End;
```

```
END; (de CreaArchivo)
```

```
(.....)
```

```
PROCEDURE LeeVariables; (este procedimiento lee la concentracion
la temperatura y el pH, para que puedan
ser guardados en el archivo)
```

```
VAR
```

```
  respCon, respResist, respTemp, respPH: Real;
```

```
BEGIN
```

```
  WRITELN; WRITELN;
```

```
  WRITE('Concentracion ? (M) ');
```

```
  READLN(respCon); WRITELN; WRITELN;
```

```
  WRITE('Temperatura ? ');
```

```
  READLN(respTemp);
```

```
  WRITELN; WRITELN;
```

```
  WRITE('pH ? ');
```

```
  READLN(respPH);
```

```

WITH ArchivReg DO
    Begin
        Concentracion:=respCon;
        Temperatura:=respTemp;
        pH:=respPH;
    End;

```

END; (de LeeVariables)

(.....)

PROCEDURE GuardaVariables; (este resultado escribe
los resultados en disco)

```

Begin
    WRITELN; WRITELN;
    ArchivReg.Resistencia:=Result#Resist;
    WRITELN('Guardando resultados en el Archivo ', ArchivNoob);
    WRITE(Archivo, ArchivReg);
    Delay(1000);

```

End; (de GuardaVariables)

(-----)

FUNCTION Resist:Real; (realiza la conversion de bytes a resist
segun el fet que se este usando)

VAR
A,B:Real;

BEGIN

CASE fet OF

1: BEGIN A:=A0; B:=B0 END;

2: BEGIN A:=A1; B:=B1 END;

4: BEGIN A:=A2; B:=B2 END;

8: BEGIN A:=A3; B:=B3 END;

End; (Case)

Resist:=A*Exp(B*ln(Bif)); (Bif es la altura de pulso en bytes)

END; (de la Funcion)

(-----)

PROCEDURE InicialdeResist; FORWARD;

(-----)

PROCEDURE Inicial; (procedimiento de inicio general. Anuncia el programa y pregunta si se abre o no un archivo.)

```
BEGIN
  SOUND(S23);
  CLRSCR;
  GotoY(5,5);
  WRITELN('PROGRAMA PARA MONITOREAR IMPEDANCIAS EN MEMBRANAS ARTIFICIALES.');
```

```
  DELAY(500);
```

```
  REPEAT
```

```
    GotoY(5,8);
```

```
    WRITE('Desea guardar los resultados en un archivo? S/N ');
```

```
    CLRScr; READ(Knd,resp);
```

```
  UNTIL resp IN 'S','s','N','n';
```

```
  IF resp IN 'S','s' THEN
```

```
    Begin
```

```
      HayArchivo:=True; CreaArchivo
```

```
    End
```

```
  ELSE HayArchivo:=False;
```

```
  Exit;
```

```
END; (de InicialGeneral)
```

```
-----)
PROCEDURE Final;
```

```
Begin
```

```
  CLRScr;
```

```
  IF HayArchivo Then
```

```
    Begin
```

```
      GotoY(20,12);
```

```
      WriteLn('Derrando el archivo ',Archivoob);
```

```
      Close(Archivo); Delay(2000); CLRScr;
```

```
    End;
```

```
  GotoY(22,12); WriteLn('¡ADIOS!'); Delay(3000); CLRScr;
```

```
  Halt
```

```
End;
```

```
-----)
PROCEDURE Mens2;
```

```
  Begin
```

```
    CLRSCR;
```

```
    GotoY(10,10);
```

```
    WRITELN('La resistencia esta fuera de la capacidad del sistema.');
```

```
    WRITELN('0','0','0','0','0','0','0','0'); Final;
```

```
  End;
```

FUNCTION CONVIERTE: Byte; (De voltaje a byte, es llamada por PULSO)

Var

Estado: Byte;

BEGIN

Port(4200):=Canal; (Canal es una constante global)

WRITE (PORT(4200) AND 01)=0 DO; (Pregunta por la señal ECG)

CONVIERTE:=Port(4200); (La funcion toma el valor resultante)

CONVIERTE:=Port(4200);

END;

PROCEDURE MUESTREA;

(obj.: Toma quince muestras cada 3 mseg. por los que la duracion es de un poco mas de 45 mseg. El resultado, -tipo Byte-, se llama boit (real). Es llamado por PULSO y por MUESTREA)

Type

Muestras=array[1..15] of Byte;

Var

Muestra:Muestras;

I, SUMA: Integer;

BEGIN

Boit:=0;

SUMA:=0;

FOR I:=1 TO 15 DO (toma 15 muestras)

BEGIN

DELAY(3); (toma las muestras cada 3 milisegs)

Muestra[I]:=CONVIERTE;

SUMA:=SUMA + Muestra[I];

END; (del for)

Boit:=SUMA/15;

END; (de MUESTREA)

PROCEDURE PULSO; (Manda pulso, toma 10 Muestras calculando su promedio llamado "Boit"(real y global). Esto lo hace llamando a Muestrea; y apaga el pulso tambien depende de Fet que es global)

```

BEGIN
  SOUND(B60);
  PORT1(2011)=Fet * 128; (anda el pulso con el fet encendido)
  DELAY(2); (retardo para que el pulso se estabilize)
  MUESTREA; (llama al proced. Muestra)
  PORT1(2011)=Fet; (apaga el pulso pero mantiene el fet)
  RESOUND;
END; (de pulso)

```

(-----)

PROCEDURE TIERRA; (Obj: chequea el nivel de tierra a la salida.
 Detiene el programa hasta que el nivel
 de voltaje se encuentre entre 0 y el voltaje
 en el que se calibraron 1/4 de los FETS,
 o al oprimir F10. Es usado por Midiendo.)

```

Var   Bytain, Bytes: Byte;

```

```

BEGIN

```

```

  CASE Fet OF
    1: BEGIN Bytain:= 0; Bytes:=4 END;
    2: BEGIN Bytain:= 0; Bytes:=4 END;
    4: BEGIN Bytain:= 0; Bytes:=5 END;
    8: BEGIN Bytain:= 0; Bytes:=5 END;
  END;

```

```

FOR J:= 1 TO 10 DO WRITELN;
WRITE('Espere a que el nivel se estabilize, y el programa');
WRITE(' continúe automáticamente. (Si el circuito está frío)');
WRITELN(' puede tardar hasta 3 minutos.1'); losVideo;
WRITELN('Si no desea esperar, oprima F10 durante 6 segs. '); MoreVideo;
FOR J:=1 TO 6 DO WRITELN;
Write('Checando nivel de tierras');

```

```

DEFCAT
  BEGIN
    Delay(1000); MUESTRAS;
    GetAY(51,25); ClrEol;
    WRITE(Round(10001(bit/51),' 6V');
  END

```

```

UNTIL
  (((Bit)Bytain AND (Bit)(/Anx)) OR KEYPRESSED);
WRITELN;

```

```

END; (de Tierra)

```

(##### Procedimiento Ajustafets #####)

PROCEDURE Ajustafets;

(Obj.: Situa el sistema en el rango adecuado, no importando el estado desde el cual se encuentra.)

PROCEDURE Fet3; (procedimiento interno de Ajustafets)

```
BEGIN
  CLRSCL;
  WRITELN('Ajustando el Sistema.                Probando con el Fet3. ');
  Tierra;
  Muestrea;
  x1:=bolt;
  Pulso; (envia un pulso de prueba)
  x2:=bolt;
  IF x2>254
  THEN
    Mens2
  ELSE begin
    if x2-x1>20
    then begin
      PORT[42011]=0; Fet3=8
    end (se ajusta el fet3)
    else begin
      PORT[42011]=4;
      Fet3=4;
      (se llama Ajustafets asi cinco)  Ajustafets
    end
  end;
END; (de Fet3)
```

PROCEDURE Fet2;

```
BEGIN
  CLRSCL;
  WRITELN('Ajustando el Sistema.                Probando con el Fet2. ');
  Tierra;
  Muestrea;
  x1:=bolt;
  Pulso;
  x2:=bolt;

  IF x2-x1>16
  THEN begin
    PORT[42011]=0;
    Fet1=0;
    Ajustafets;
  end
  ELSE BEGIN
    if x2-x1>16
    then begin
      PORT[42011]=4; Fet1=4
    end
  end
END;
```

```

else
begin
PORT[4201]=2; Fet:=2;
Ajustafets
end
END;

END; (de Fet2)

PROCEDURE Fet1;
BEGIN
CLASCR;
WRITE('Ajustando el Sistema. Probando con Fet1.');
```

Tierras;
Muestras;
x1:=boit;
Pulso;
x2:=boit;

```

IF x2-x1>250
THEN begin
PORT[4201]=4; Fet:=4;
Ajustafets
end
ELSE begin
if x2-x1>23
then begin
PORT[4201]=2; Fet:=2
end
else begin
PORT[4201]=1; Fet:=1;
Ajustafets
end
end;
END; (de Fet1)

PROCEDURE Fet0;
BEGIN
CLASCR;
WRITE('Ajustando el Sistema. Probando con el Fet0.');
```

Tierras;
Muestras;
x1:=boit;
Pulso;
x2:=boit;

```

IF x2-x1>217
THEN begin
PORT[4201]=2; Fet:=2;
Ajustafets
end
end;

```

```

ELSE Begin
  If x2-x1=1
  then begin
    PORT(4201)=1; Fet1=1
    and
    else
      Mens2

  End;
END; (de Fet0)

(**** programa principal del procedimiento Ajustafets ****)
BEGIN
  SOUND(622); DELAY(500); MMSOUND;
  CASE Fet OF
    1:Fet0;           (el procedimiento recibe al sistema)
    2:Fet1;           (con alguno estado: Fet0....Fet3, y )
    4:Fet2;           (lo devuelve en alguno de dichos estados)
    8:Fet3;
  END; (del CASE)

  ClrScr;

  CASE Fet OF
    1: BEGIN
      WRITELN('La resistencia esta en el rango de: 100 a 1000 Megohms.');
```

DELAY(1000)

```
      END;

    2: BEGIN
      WRITELN('La resistencia esta en el rango de: 10 a 100 Megohms.');
```

DELAY(1000)

```
      END;

    4: BEGIN
      WRITELN('La resistencia esta en el rango de: 1 a 10 Megohms.');
```

DELAY(1000)

```
      END;

    8: BEGIN
      WRITELN('La resistencia esta en el rango de: 100 a 1000 Kilohms.');
```

DELAY(1000)

```
      END;
  END; (del CASE)

END; (***** Termina Ajustafets *****)

```

PROCEDURE InicialdeResist; (prepara al sistema para empezar a medir)

```
BEGIN
  ClrScr; GotoY(1,5);
  WRITE('Intervalo Temporal entre los Pulsos ? (seg.) ');
  READLN(frec);
  Port(4201)=0; fct=0; (se activa el fet 3 por seguridad)
  GotoXY(1,8);

  write('Coloque la sonda y encienda la tableta.');
```

GotoY(1,20); lowVideo;

```
WRITELN('Oprima cualquier tecla cuando este listo.');
```

REPEAT UNTIL KEYPRESSED; HoraVideo;

```
END; (de InicialdeResist)
```

PROCEDURE Midiendo; (envia una serie de pulsos tomando una lectura antes y durante C/us. Toma la diferencia y la compara con la del anterior para determinar si la resistencia se ha estabilizado.)

```
BEGIN
  ClrScr;
  WRITELN('Midiendo');
```

muestrea; x1:=halt;

Pulso; x2:=halt;

Dif:=x2-x1;

```
REPEAT Begin
  Difant:=Dif;
  DELAY(ROUND(frec*1000));
  muestrea; x1:=halt;
  Pulso; x2:=halt;
  IF (x2 > 250)OR(x2 < 10)
    THEN Begin
      Ajustefet; Midiendo;
    End;
  Dif:=x2 - x1;
  WriteLn;
  WRITE('x1=',Round(x1),' x2=',Round(x2),' dif=',Round(x2-x1));
  WRITELN(' Resistencia: ', Resist613,' Megohms.');
```

Resultfresist:=Resist;

```
End;
UNTIL ABS(Difant-Dif)/Dif < Prec;
```

WRITELN; WRITELN;

```
WRITELN('Si la resistencia se ha estabilizado en ',Resist613,' Megohms.');
```

OUND(654); Delay(300); MESSAGES; Delay(1000);

```
END; (de midiendo)
```

(-----)
PROCEDURE Preguntas;

```
Begin  
  Write1; Write2; Write3;  
  cord1:=Where1; cord2:=Where2;  
  Repeat  
    GetXY(1, cord1);  
    Write("Desa Continuar ? (S/N)");  
    Read(Ord, resp);  
  Until resp IN ('s', 'S', 'n', 'N');  
  
  CASE resp OF  
    's', 'S': Salgo:=False;  
    'n', 'N': Salgo:=True;  
  END;  
  CtrScr;  
End; (de Preguntas)
```

(-----INICIA PROGRAMA PRINCIPAL-----)

```
BEGIN  
  Inicializa1;  
  Inicializa2;  
  CtrScr;  
  AjustaFnts;  
  MtrEAI  
  IF HayArchivo THEN LeeVariables;  
  Midiendo;  
  IF HayArchivo THEN GuardaVariables;  
  Preguntas;  
  UNTIL Salgo;  
  Final;  
END.
```


Listado del Programa de Procesamiento ARCHIVOS.PAS:

PROGRAM Archivos; (Este programa lee los archivos de
Tetradas (Concentracion, Resistencia,
Temperatura, y pH) generados por
el programa Hidres5, y ajusta una recta.
Guarda los resultados en archivos de Monadas
de los cuales tambien despliega y escribe a
disco desde el teclado)

TYPE

Tetradas = RECORD

Concentracion, Resistencia, Temperatura, pH: Real;

END;

Monadas = RECORD

ArchMonCur: String(14);
MondeFus, puntoM: Integer;
MonResist, MonConst, MonTemp, MonpH: Real;
MonCorr, MonPend, MonOrd: Real;

END;

Monar = String(20);

VAR

Archivo : File of Tetradas;
ArchivReg: Tetradas;
Archivoad: String(14);

ArchMonadas: File of Monadas;
MonadasReg: Monadas;
ArchMonCur, ArchMonPoint: String(14);

TamanoArchivo, Kent, Yant, I, J: Integer;
respt char;

concentMin, concentMax, resistMin, resistMax: Real;

```
FUNCTION Exist(fileName: Name): Boolean;
```

(esta funcion busca el archivo en el disco.
Resulta 'false' si no hay un archivo con el
nombre en su arquetipo, evitando que el programa
se aborte)

```
VAR
```

```
    Fil: File;
```

```
Begin
```

```
    Assign(Fil, File(zuel);
```

```
    {FI-}
```

```
    Reset(Fil);
```

```
    {Si-}
```

```
    Exist := (IOresult = 0)
```

```
End;
```

```
(.....)
```

```
PROCEDURE DespliegaArch; (despliega en columnas los archivos.BAT)
```

```
Begin
```

```
    ClrScr; TextMode(4350);
```

```
    GotoXY(20,1); Write('Archivo ',ArchivNom); LowVideo;
```

```
    GotoXY(2,3);
```

```
    WriteLn('Concentracion (M)      Resistencia (ohms)      Temperatura      pH');
```

```
    GotoXY(1,25);
```

```
    Write('Oprea cualquier tecla para continuar.....'); HighVideo;
```

```
    Window(1,5,80,25);
```

```
    Reset(Archivo); GotoXY(5,1);
```

```
    FOR I:=1 TO TamañoArchivo DO
```

```
        Begin
```

```
            Read(Archivo, ArchivReg);
```

```
            GotoXY(5,WhereY); Write(ArchivReg.Concentracion:10);
```

```
            GotoXY(30,WhereY); Write(ArchivReg.Resistencia:10);
```

```
            GotoXY(54,WhereY); Write(ArchivReg.Temperatura:4:2);
```

```
            GotoXY(67,WhereY); Write(ArchivReg.pH:2:2); WriteLn;
```

```
        End;
```

```
    Repeat I:=1 UNTIL Keypresscd;
```

```
    Window(1,1,80,25); ClrScr;
```

```
End; ( de Despliega )
```

PROCEDURE Primeros; (presenta al programa, y pregunta el nombre del archivo, y lo despliega en la pantalla.)

VAR Salgo: Boolean;

BEGIN

ClrScr;
GotoY(2,4);
WriteLn('Este Programa lee los archivos generados por Hidres5.');

GotoY(2,6);
WriteLn('Despliega la grafica de LogS v.s. LogE, y ajusta una recta a esos puntos.');

REPEAT

GotoY(2,16); ClrEol;
Write('Nombre del archivo a procesar ? (dinamico.BAT) ');
ReadLn(Archivonomb); Salgo:= True;
IF NOT Exist(Archivonomb) THEN Begin
GotoY(2,16);
Write('O'El Archivo ', Archivonomb, ' no existe.');

Delay(1500);
GotoY(2,18); ClrEol;
Salgo:= False;
End;

UNTIL Salgo;

Assign(Archivo, Archivonomb);
Reset(Archivo);
TamanoArchivos:=FileSize(Archivo)-1;
GotoY(2,16);
WriteLn('El archivo ', Archivonomb, ' consta de ', TamanoArchivos, ' tetradas');

LowVideo;

REPEAT

GotoY(2,22);
Write('Desea verlo? S/N ');
ClrEol; READLN(resp); WRITELN(' ');

UNTIL resp IN ('S', 's', 'N', 'n');

HighVideo;

IF resp IN ('N', 'n') THEN DespliegaArch;

END; (de primero)

```
PROCEDURE Calcularangos; ( este procedimiento calcula el rango de la
                          la concentracion y la resistencia para
                          graficar )
```

```
Var
```

```
    concentTemp, resistTemp:Real;
```

```
BEGIN
```

```
    ClrScr;
    Reset(Archivo);
    Read(Archivo, ArchivReg);
    concentMax:=ArchivReg.Concentracion; concentMin:=ArchivReg.Concentracion;
    resistMin:=ArchivReg.Resistencia; resistMax:=ArchivReg.Resistencia;
```

```
    FOR I:=1 TO TamañoArchivo-1 DO
```

```
        Begin
```

```
            Read(Archivo, ArchivReg);
            concentTemp:=ArchivReg.Concentracion;
            resistTemp:=ArchivReg.Resistencia;
```

```
            IF concentMin>concentTemp THEN concentMin:=concentTemp;
            IF concentMax<concentTemp THEN concentMax:=concentTemp;
```

```
            IF resistMin>resistTemp THEN resistMin:=resistTemp;
            IF resistMax<resistTemp THEN resistMax:=resistTemp;
```

```
        End;
```

```
    Reset(Archivo);
    WRITELN; WRITELN;
    Write('La Concentracion Maxima es: '); LowVideo;
    WriteLn(concentMax:10, ' N'); NoeVideo;
    Write('La Concentracion Minima es: '); LowVideo;
    Write(concentMin:10, ' N'); NoeVideo;
    GotoXY(1,10);
    Write('La Resistencia Maxima es: '); LowVideo;
    WriteLn(resistMax:10, ' ohms'); NoeVideo;
    Write('La Resistencia Minima es: '); LowVideo;
    WriteLn(resistMin:10, ' ohms');
    GotoXY(1,24); LowVideo; Write('Dpina cualquier ...');
    NoeVideo; Repeat I:=1 UNTIL
```

```
END; (de calcularangos)
```

```
PROCEDURE LeeArchRes; ( este proced muestra los archivos de resultados
                      tipo .RES, corresponde a la opción 2 del menu )
```

```
Var Salto: Boolean;
```

```
(-----)
```

```
Procedura Muestra(Var pos: Integer); ( procedimiento interno de LeeArchRes )
```

```
Begin
```

```
  LowVideo;
  Seek(ArchMonedas, pos-1);
  Read(ArchMonedas, MonedasReg);
  GotoY(3,5);
  Write('n perlin del punto: ', MonedasReg.puntoN, ' ');
  GotoY(3,7);
  Write('Concentracion: ', MonedasReg.MonaConstB, ' n ');
  GotoY(3,9);
  Write('Resistencia: ', MonedasReg.MonaResistaB, ' mas ');
  GotoY(3,11);
  Write('Pendiente de la recta: ', MonedasReg.MonaPendiente, ' ');
  GotoY(3,13);
  Write('Ordenada: ', MonedasReg.MonaOrd:6:4, ' ');
  GotoY(3,15);
  Write('Correlacion: ', MonedasReg.MonaCorrelat, ' ');
  GotoY(3,17);
  Write('Ajustada con ', MonedasReg.MonaPun, ' puntos. ');
  GotoY(3,19);
  Write('Temperatura: ', MonedasReg.MonaTemp:2, ' ');
  GotoY(3,21);
  Write('phi: ', MonedasReg.MonaPhi:2, ' ');
```

```
End; ( de muestra )
```

```
(-----)
```

```
RESIR ( de LeeArchRes )
```

```
  ClrEcr;
  TextMode(800);
  GotoY(3,3);
  Write('Este procedimiento despliega archivos tipo .RES que son resultados');
  GotoY(3,4);
  Write('de los ajustes de recta a los datos de los archivos tipo .DAT');
  REPEAT
    GotoY(,12); ClrEol;
    Write('Nombre del archivo ? (Dentro.RES) ');
    Readln(ArchHombRes); Salto:= True;
    IF not Exist(ArchHombRes) THEN Begin
      GotoY(3,14);
      Write('E El Archivo ', ArchHombRes, ' no existe. ');
      Delay(1500);
      GotoY(3,14); ClrEol;
      Salto:= false;
    End;
```

```
UNTIL Salto;
```

```

Assign( ArchMonedas, ArchMonRes);
Reset( ArchMonedas); Read( ArchMonedas, MonedasReg);
ClrScr;
GotoY(3,2);
.....
LowVideo; Write(MonedasReg, ArchMonRes, ' ');
For J:=1 TO FileSize(ArchMonedas) DO
begin
  Muestra(' ');
end; (del For);

KaraVideo;

REPEAT
  salte:=false;
  GotoY(3,23); KaraVideo; ClrScr;
  Write('Numero de punto que desea ver: ');
  Read(I);

  IF ((FileSize(ArchMonedas) <= I) && (I <= 100)) THEN Muestra(I)
  ELSE salte:=true;

UNTIL salte;

Reset(ArchMonedas);
KaraVideo;
ClrScr;

```

EKO; (de LeerArchReg)

(+++++.....)

PROCEDURE DibujaGraf; (Este procedimiento grafica Log(R) v.s. Log(CI)

VAR

```

puntoIni, K: Integer;
LogResMax, LogResMin, LogConsMax, LogConsMin: Integer;
PasoResist, PasoConst: Integer;
cordC1ant, cordC2ant, cordR1ant, cordR2ant: Integer;
Ordenada, Pendiente, Corr: Real;
SumaY, SumaX, SumaYCuad, SumaXCuad: Real;
EscalaR, EscalaC, LogR, LogC, InIO: Real;
Concent, Resist: Real;
salte: Boolean;

```

PROCEDURE Puntos; (Procedimiento interno que pone los puntos)

BEGIN

Reset(Archivo);

FOR I:=1 TO TamañoArchivo DO

Begin

Read(Archivo, ArchivReg);

LogR:=EscalaR*(Ln(ArchivReg.Resistencia)/Ln10-LogResMin);

LogC:=EscalaC*(Ln(ArchivReg.Concentracion)/Ln10-LogConstM);

Plot(Round(LogC*25),Round(170-LogR),15);

End;

END; (de puntos)

(-----)

PROCEDURE Regresion; (procedimiento interno de dibujo graf.
Calcula la pendiente, la ordenada al
origen, y el coeficiente de correlacion)

BEGIN

Seek(Archivo, puntoIni-1);

N:=FileSize(Archivo)-puntoIni; (recuerdos que los archivos terminan en cero)

Ln10:=Ln(10);

SumaY:=0; SumaX:=0; SumaXY:=0; SumaCuadrX:=0; SumaCuadrY:=0;

For I:=puntoIni-1 To FileSize(Archivo)-2 Do (si el archivo no termina con ceros
cero por que 1 en lugar de 2)

Begin

Read(Archivo, ArchivReg);

LogC:=Ln(ArchivReg.Concentracion)/Ln10;

LogR:=Ln(ArchivReg.Resistencia)/Ln10;

SumaY:=SumaY+LogR;

SumaCuadrY:=SumaCuadrY+LogR*LogR;

SumaX:=SumaX+LogC;

SumaCuadrX:=SumaCuadrX+LogC*LogC;

SumaXY:=SumaXY+LogC*LogR;

End;

(calculando la ordenada, la pendiente y el coef de correlacion)

Ordenada:=(SumaYcuad-SumaY-SumaX(SumaY))/(N(SumaYcuad-sqr(SumaX)));

Pendientes:=(N(SumaX)-SumaX(SumaY))/(N(SumaYcuad-sqr(SumaX)));

Corr:=(N(SumaY-SumaX(SumaY))/sqr((N(SumaYcuad-sqr(SumaX)))*(N(SumaYcuad-sqr(SumaY))));

Reset(Archivo);

Enq; (de regresion)

(-----)

PROCEDURE TrazaRecta; (traza la recta ajustada)

VAR

LogC1, LogC2, LogR1, LogR2; Real;
cordC1, cordC2, cordR1, cordR2; Integer;

Begin

Seek(Archivo, puntoIni-1);

Read(Archivo, ArchivReq);

LogC1:=Ln(ConcentMin)/Ln10;

LogR2:=Ln(ResistMin)/Ln10;

LogR1:=Ordenada+Pendientes*LogC1; (calcula la resistencia segun la recta ajustada)

LogC2:=(LogR2-Ordenada)/Pendientes;

cordC1:=Round(EscalaC1(LogC1-LogConsMin)*25);

cordC2:=Round(EscalaC1(LogC2-LogConsMin)*25);

cordR1:=Round((170-EscalaR1(LogR1-LogResMin)));

cordR2:=Round((170-EscalaR1(LogR2-LogResMin)));

Draw(cordC1, cordR1, cordC2, cordR2, 15); (se traza la recta)

cordC1anti:=cordC1; (se guardan los parametros de la recta)

cordC2anti:=cordC2; (para borrarla despues)

cordR1anti:=cordR1;

cordR2anti:=cordR2;

End; (de traza recta)

(##### Inicia Bloque principal de DibujaGraf #####)

BEGIN

ClrScr; HiRes; (entramos a un modo de 640x260 puntos)

Draw(25,10,25,170,15); (dibuja eje Y, (LogResist))

Draw(25,170,625,170,15); (dibuja eje X, (LogCons))

cordC1anti:=1; cordC2anti:=1; cordR1anti:=1; cordR2anti:=1;


```
Ln10:=Ln(10);
```

```
GotoY(2,1); Write('Log[R]'); (ponemos nombre a los ejes)  
GotoY(74,25); Write('Log[C]');  
GotoY(30,1); Write('Archivo ',ArchivNom);
```

```
j:=0;  
Repeat j:=j+1 Until (Ln(resistMax)/Ln10;  
LogResMax:=j;
```

```
j:=15;  
Repeat j:=j-1 Until (Ln(resistMin)/Ln10;  
LogResMin:=j;
```

```
j:=10;  
Repeat j:=j+1 Until (Ln(concentMax)/Ln10;  
LogConMax:=j;
```

```
j:=15;  
Repeat j:=j-1 Until (Ln(concentMin)/Ln10;  
LogConMin:=j;
```

```
EscalaR:=160/(LogResMax-LogResMin);  
EscalaC:=600/(LogConMax-LogConMin);  
PasoResist:=Round(EscalaR);  
PasoConst:=Round(EscalaC);
```

```
(dibujando las divisiones en Y )  
FOR I:=0 TO LogResMax-LogResMin DO
```

```
    Begin  
        Draw(25,170-I*PasoResist,70,170-I*PasoResist,15);  
        GotoY(I, Round(22-(I*PasoResist/8))); Write(LogResMin+I);  
    End;
```

```
(dibujando las divisiones en X )  
FOR I:=0 TO LogConMax-LogConMin DO
```

```
    Begin  
        Draw(75+I*Round(PasoConst/2),170,25+I*Round(PasoConst/2),175,15);  
        GotoY(Round(3+I*PasoConst/16.5),23);  
        Write(LogConMin+I/2.3:1);  
    End;
```

```
PD@UNTOS; (poniendo los puntos )
```

```

REPEAT
  salte:=false;
  GotoY(1,25);
  Write('A partir de que punto desea ajustar la recta ? O(NC)', TamanoArchivo, ' (0 para salir) ');
  GotoY(71,25);

```

```

  Read(PuntoIni);

```

```

  IF (puntoIni<TamanoArchivo) AND (puntoIni>0) THEN
  Begin

```

```

    Seek(Archivo, puntoIni-1);
    Read(Archivo, ArchivReg);
    Concent:=ArchivReg.Concentracion;
    Resist:=ArchivReg.Resistencia;
    Regresion;
    GotoX(6,12); Write('a partir del ',puntoIni,' ');
    GotoY(6,14); Write('(',Concent:6,' ',Resist:8,')');
    GotoY(6,17); Write('pendientes:4,' ');
    GotoY(6,19); Write('ordenadas:4,' ');
    GotoY(6,21); Write('corr: ',Corr:6:4,' ');

```

```

    (borrando la recta anterior)
    DrawCoord(ant, cordAnt, cord2ant, cordR2ant, 0);
    Pospuntos;
    TrazaRecta;

```

```

  End

```

```

  ELSE salte:=true

```

```

UNTIL salte;

```

```

Repeat

```

```

  GotoY(1,25);

```

```

  Write('Desea guardar estos resultados en un archivo ? S/N ');

```

```

  Read(Kbd,resp);

```

```

  Until resp IN ['s','S','n','N'];

```

```

  IF resp IN ['s','S'] THEN (abriendo un archivo extension .RES)

```

```

  Begin

```

```

    ArchNoobNient:=ArchNoob;

```

```

    DELETE(ArchNoobNient,POS(' ',ArchNoob)+1,3);

```

```

    ArchNoobRes:= ArchNoobNient+'RES';

```

```

    Assign(ArchMonadas, ArchNoobRes);

```

```

    TextMode; GotoY(3,1);

```

```

    Write('Abriendo Archivo '); LowVideo;

```

```

    Write(ArchNoobRes);

```

```

    Rewrite(ArchMonadas); Delay(2000); HighVideo;

```

```

    ClrScr; GotoY(3,2);

```

```

    Write('Escribiendo resultados en el archivo ');

```

```

    LowVideo; Write(ArchNoobRes);

```

WITH MonadasReg 50

Begin

```
ArchMonbCor esp:=ArchivMonb;  
punto#:1;  
MonbFunc:=TamanoArchivo-J+1;  
KonaResist:=ArchivReg.Resistencia;  
KonaConst:=ArchivReg.Concentracion;  
KonaTemp:=ArchivReg.Temperatura;  
KonaPh:=ArchivReg.pH;  
KonaCorr:=Corr;  
KonaPendi:=Pendiente;  
KonaOrds:=Ordenada;  
Write(ArchMonadas, MonadasReg);
```

End; (del with)

```
GotoXY(3,5);  
Write('A partir del punto: ', MonadasReg.punto0);  
GotoXY(3,7);  
Write('Concentracion: ', MonadasReg.KonaConst:9, ' R');  
GotoXY(3,9);  
Write('Resistencia: ', MonadasReg.KonaResist:8, ' Ohm');  
GotoXY(3,11);  
Write('Pendiente de la recta: ', MonadasReg.KonaPendi:6);  
GotoXY(3,13);  
Write('Ordenada: ', MonadasReg.KonaOrds:6);  
GotoXY(3,15);  
Write('Correlacion: ', MonadasReg.KonaCorr:6);  
GotoXY(3,17);  
Write('Ajustada con ', MonadasReg.MonbFunc, ' puntos. ');  
GotoXY(3,19);  
Write('Temperatura: ', MonadasReg.KonaTemp:6);  
GotoXY(3,21);  
Write('pH: ', MonadasReg.KonaPh:6);
```

END; (del For)

```
KonaVideo; GotoXY(3,23);  
Write('Cerrando el archivo ');  
LowVideo; Write(ArchMonbRes);  
Close(ArchMonadas); Delay(2000);  
GotoXY(3,25); LowVideo;  
Write('Oprima cualquier tecla para continuar.....');  
Repeat I:=1 Until Keypressed; KonaVideo;
```

End; (del IF)

```

Reset(Archivo);

END; (de Dibujagraf)
(*****)

PROCEDURE MatearchRES;

Begin

ClrScr; GotoY(28,12); Write('G/No Implementada. ');
Delay(2000);

End;
(*****)

PROCEDURE MeterchBNI; (procedimiento para escribir archivos DAT
en disco a traves del teclado)

Var
    respCon, respResist, respTemp, respPHr Real;
    Salte: Boolean;

BEGIN
    ClrScr; TextMode(CSO);
    Write('De el Drive, el Nombre del Archivo y la Extension .DAT');
    WriteLn(' (Puede ser la Fecha)');
    REPEAT
        GotoY(1,4); ClrEol;
        Write('Nombre del archivo ? ');
        Readln(ArchivHoab); Salte:= True;
        IF Exist(ArchivHoab) THEN Begin
            GotoY(1,6);
            Write('G/El Archivo ', ArchivHoab, ' ya existe. ');
            Delay(1500);
            GotoY(1,6); ClrEol;
            Salte:= False;
        End;
    UNTIL Salte;

    Assign(Archivo, ArchivHoab);
    Rewrite(Archivo);
    GotoY(1,6); Write('Temperatura a la que se realizo el experimento ? ');
    Readln(respTemp);
    GotoY(1,8); Write('pH de la solucion ? ');
    Readln(respPH);

    LowVideo;
    GotoY(1,12);
    WriteLn('Cosienez por los puntos de minima concentracion, y');
    WriteLn('Ponga ceros para cerrar el archivo. ');
    #0#rVideo;

```

REPEAT

```
GotoY(1,20); ClrEol;  
Write("G, 'Concentration ? '); ReadLn(respCon);  
GotoY(40,20); ClrEol;  
Write("G, 'Resist ? '); ReadLn(respResist);
```

```
WITH ArchivReq DO Begin  
    Concentracion:=respCon;  
    Resistencia:=respResist;  
    Temperatura:= respTemp;  
    pH:= respPH;  
    Write(Archivo, ArchivReq);  
End;
```

UNTIL (respCon=0) and (respResist=0);

```
GotoY(1,24);  
WriteLn("G Corriendo Archivo ", ArchivReq); Delay(1000);  
Close(Archivo); ClrScr;
```

END;

(.....)

PROCEDURE Validar;

Begin

```
TextMode(C80); ClrScr;  
Sound(1200); Delay(400); NoSound;  
GotoY(25,12); Write('ADIOS !'); GotoY(1,1);  
Delay(1500);  
ClrScr; TextMode(C20); Halt
```

End;

***** INICIA PROGRAMA PRINCIPAL *****

BEGIN

REPEAT

```
ClrScr; TextMode(C80); GotoY(3,3); Sound(1380);
Write('PROGRAMA PARA PROCESAR RESULTADOS DE EXPERIMENTOS EN MEMORIAS ARTIFICIALES');
Delay(500); Nosound;
LcdVideo;
GotoY(6,10);
Write('1.- Lectura de un archivo tipo .DAT y ajuste de regla. ');
GotoY(8,12);
Write('2.- Lectura de un archivo tipo .RES ');
GotoY(10,14);
Write('3.- Creacion de un archivo tipo .DAT a traves del teclado. ');
GotoY(12,16);
Write('4.- Creacion de un archivo tipo .RES a traves del teclado. ');
GotoY(14,18);
Write('5.- Salida del Program. ');
MoreVideo;
```

REPEAT

```
    GotoY(2,22); ClrEol;
    Write('Eleccion ? ');
    Read(Kbd,resp);
```

UNTIL resp IN ('1','2','3','4','5');

CASE resp OF

```
'1': Begin Primeros; CalcularAngos; DibujaGraf End;
'2': Begin LeeArchRes End;
'3': Begin MetarchDAT End;
'4': Begin MetarchRes End;
'5': Salido;
```

END; (del CASE)

UNTIL I=2;

END. (del programa principal)

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Albert Lehninger: "Biochemistry", 2nd. Ed. 1973 Worth Publishers, Inc.
- 2.- Singer, S.J. and G.L. Nicolson (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Membranes, *Science*, 175: 720 - 731.
- 3.- W. Hughes: "Aspects of Biophysics". John Wiley & Sons, New York 1979.
- 4.- H.B. Callen; "Thermodynamics"; John Wiley & Sons, New York 1964.
- 5.- F.C. Andrews; "THERMODYNAMICS: Principles and Applications"; Wiley Interscience, John Wiley & Sons, 1971.
- 6.- P.J. Garrahan y A.F. Rega; 1977 "Transporte a Través de la Membrana Celular"; Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Dept. de Asuntos Científicos; Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos; Washington, D.C.
- 7.- A. Hernández, J.A. Ibañez, y A.F. Tejerina; A Selective Parameter for Ionic Membranes; en *Proceedings of the Europe-Japan Congress on Membrane Processes 1984 in Stresa, Italy*; Editado por E. Drioli y M. Nakagaki, 1988 Plenum Press, New York.
- 8.- M. Moreno-Bello, et. al. (1980); Mezcla de Poblaciones en Poros de Membranas Artificiales Tratadas con Nistatina; *Revista de la Academia de Ingeniería*, Vol.5, C, 72.
- 9.- H. Tl. Tien, "BILAYER LIPID MEMBRANES (BLM), theory and practice", Marcel Dekker, Inc. New York, 1974.

- 10.- De Kruijff B. Demel R.A. (1974), Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* Cells and Lecithin Liposomes, *Biochim. et Biophys. Acta*, 329: 57-70.
- 11.- Hoogevest P. Van, De Kruijff B., (1978) Effect of Amphotericin-B on Cholesterol-Containing Liposomes of Egg Phosphatidylcholine and Didocosanyl Phosphatidylcholine, *Biochim. et Biophys. Acta*, 511: 367-307.
- 12.- Kleinberg M. E., Finkelstein A., (1984). Single-Length and Double-Length Channels Formed by Nystatin in Lipid Bilayer Membranes. *J. Membrane Biol.* 80: 237-250.
- 13.- Jordan P.C. (1982) Electrostatic Modeling of Ion Pores. *Biophys. J. Biophysical Society* 39: 157-164.
- 14.- Ben E. Glina, "An Introduction to Automated Data Acquisition" 1983 Prentice Hall Books; New York, Princeton.
- 15.- J. M.^a Fuentes i Armengol, "Convertidores A/D y D/A", en "Interconexión de Periféricos a Microprocesadores", editado por José Mospín Poblet; Marcombo, Ediciones Editoras; 1983, Barcelona.
- 16.- B.P. Lathi; "Introducción a la Teoría y Sistemas de Comunicación"; 1974, Ed. Limusa S.A., México.
- 17.- "The Linear Control Circuits Data Book for Design Engineers", 2nd. Ed, Texas Instruments Inc.; Dallas, Texas.
- 18.- Rodríguez Espinosa M., Rodríguez Rossini G., Rojas Villanueva M. "Microcomputadora Básica de Desarrollo MICDZ; *Rev. Mex. de Ingeniería Biomédica*, Vol. VIII, No.1, oct. 1987