

“SISTEMA DE MONITOREO DE VARIABLES EN UN BIORREACTOR PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HUMANAS”

MAYRA ALEJANDRA BALLESTEROS BARRAGAN

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE ELECTRÓNICA  
MAESTRIA EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA  
BOGOTÁ D.C.  
2014

“SISTEMA DE MONITOREO DE VARIABLES EN UN BIORREACTOR PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS HUMANAS”

MAYRA ALEJANDRA BALLESTEROS BARRAGAN

TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA

T.I.MIE-1326

DIRECTOR

ING.FREDY O. RUIZ Ph. D.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE ELECTRÓNICA  
MAESTRIA EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA  
BOGOTÁ D.C.  
2014

# INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>OBJETIVOS</b> .....	8
GENERAL .....	8
ESPECÍFICOS .....	8
<b>1. DESCRIPCION DEL HARDWARE</b> .....	9
1.1 ESPECIFICACIONES GENERALES.....	9
1.2 BIORREACTOR .....	9
1.3 INSTRUMENTACION.....	10
1.4 SISTEMA DE CONTROL SUPERVISORIO CON CRIO .....	13
1.5 INTERFAZ GRAFICA LOCAL.....	14
<b>2. ARQUITECTURA DE LA APLICACION</b> .....	15
2.1 OPERACION GENERAL DEL CULTIVO .....	15
2.2 ARQUITECTURA DE PROGRAMACION (TIEMPO REAL?- DETERMINISTICO?).....	16
2.3 DIAGRAMA EN BLOQUES DE LA SOLUCIÓN.....	17
2.4 MODULO DE ADQUISICION .....	18
2.4.1 LOOP DETERMINISTICO .....	18
2.4.2 ESCALIZACIÓN, CONVERSIÓN Y ESCALIZACIÓN ESPECIAL .....	19
<b>2.5 MODULO DE CONTROL</b> .....	<b>20</b>
2.5.1 CONTROL DE METANOL.....	20
<b>2.6 MODULO DE COMUNICACIONES</b> .....	<b>21</b>
2.6.1 MONITOREO REMOTOS .....	21
2.6.2 MENSAJES DE CORREO ELECTRONICO .....	21
2.6.3 BASE DE DATOS Y REPORTE DE EXCEL.....	23
<b>2.7 MODULO DE USUARIO</b> .....	<b>24</b>
2.7.1 OPERACION GENERAL .....	24
2.7.2 INTERFAZ DE CALIBRACION.....	29
2.7.3 INTERFAZ DE SEÑALES CONTROLADAS Y SETPOINT .....	27
2.7.4 INTERFAZ DE ALARMAS.....	29
2.7.5 INTERFAZ DE REPORTES .....	30
<b>3. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO</b> .....	<b>32</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFIA Y FUENTES DE INFORMACION</b> .....	<b>37</b>

## INDICE DE GRÁFICAS

FIGURA 1. A) BIOREACTOR. B) DISPLAY PARA CONTROLAR PH.....	6
FIGURA 2. BIOREACTOR .....	9
FIGURA 3. DISPLAY CONTROLADOR DE PH.....	10
FIGURA 4. DISPLAY CONTROLADOR DE AGITACIÓN .....	11
FIGURA 5. DISPLAY CONTROLADOR DE TEMPERATURA.....	11
FIGURA 6. DISPLAY CONTROLADOR DE ESPUMA .....	12
FIGURA 7. DISPLAY CONTROLADOR DE OXÍGENO DISUELTO .....	12
FIGURA 8. CONTROLADOR DE FLUJO DE AIRE SINTÉTICO Y BOMBA.....	13
FIGURA 9. SENSOR DE PRESION .....	13
FIGURA 10. COMPACTRIO .....	14
FIGURA 11 COMPONENTES BÁSICOS DE LA ARQUITECTURA DEL CRIO .....	17
FIGURA 12 ARQUITECTURA PARA SISTEMAS SCADA .....	17
FIGURA 13. DIAGRAMA EN BLOQUES DEL SISTEMA .....	17
FIGURA 14. DIAGRAMA DE FLUJO MODULO DE ADQUISICION DE DATOS .....	18
FIGURA 15. LOOP TEMPORIZADO CON EL CASE EN LA POSICIÓN DE TEMPERATURA. SE OBSERVAN LOS VI DE ESCALIZACION Y CONVERSIÓN .....	19
FIGURA 16. A) RUTINA DE EJECUCIÓN EN EL TARGET DE LA ADQUISICIÓN Y CONTROL DE METANOL B) RUTINA DE EJECUCIÓN DONDE SE ENCUENTRA EL CONTROL DE METANOL....	20
FIGURA 17. DIAGRAMA EN BLOQUES LOGICA CORREO ELECTRONICO.....	22
FIGURA 18. TABLAS CREADAS PARA LA BASE DE DATOS .....	23
FIGURA 19. MODELO DE LA PLANTILLA DE REPORTES DE CULTIVOS, ALARMAS, CONSTANTES, Y CALIBRACIÓN .....	24
FIGURA 20. DIAGRAMA DE FLUJO FUNCIONAMIENTO GENERAL DE LA INTERFAZ GRAFICA .	25
FIGURA 21. PANEL FRONTAL DE LA INTERFAZ GRAFICA .....	26
FIGURA 22. PANEL FRONTAL INTERFAZ DE CALIBRACION .....	27
FIGURA 23. PANEL FRONTAL INTEERFAZ DE VI PRINCIPAL CAMPO DE VISUALIZACION DE VARIABLES .....	28
FIGURA 24. PANEL FRONTAL INTERFAZ DE VI PRINCIPAL TAB DE SEÑAL DE TEMPERATURA .....	28
FIGURA 25. DIAGRAMA DE FLUJO DEL MODULO DE ALARMAS .....	29
FIGURA 26. ALERTA VISUAL Y MENSAJE AL HISTORIAL DE LA PANTALLA PRINCIPAL .....	30
FIGURA 27. DIAGRAMA DE FLUJO DEL FUNCIONAMIENTO DEL MODULO DE REPORTES .....	30
FIGURA 28. PANEL FRONTAL DEL MODULO DE REPORTES .....	31
FIGURA 29. COMPARACION DISPLAY BIOENGINIERING CON PANEL FRONTAL DE LABVIEW VARIABLE TEMPERATURA .....	32
FIGURA 30. COMPARACION DISPLAY BIOENGINIERING CON PANEL FRONTAL DE LABVIEW VARIABLE AGITACION .....	32
FIGURA 31. COMPARACION DISPLAY BIOENGINIERING CON PANEL FRONTAL DE LABVIEW VARIABLE OXIGENO DISUELTO.....	33

FIGURA 32.COMPARACION DISPLAY BIOENGINEERING CON PANEL FRONTAL DE LABVIEW VARIABLE PH .....	33
FIGURA 33.COMPARACION DISPLAY SIERRA CON PANEL FRONTAL DE LABVIEW VARIABLE FLUJO DE AIRE SINTETICO .....	33
FIGURA 34.ALARMA DE TEMPERATURA ALTA SOBREPASADA.....	34
FIGURA 35.ALARMA DE PH ALTO SOBREPASADO .....	34
FIGURA 36.ARCHIVOS DE PRUEBA PROCEDENTES DE LA BASE DE DATOS.....	35

## Introducción

¿Por qué surgen las enfermedades? ¿Qué sucede con el metabolismo del cuerpo?

Estas son las preguntas más frecuentes que las personas se realizan cuando se sufre de algún trastorno que causa malformaciones o funcionamiento inadecuado de órganos. La respuesta está en la ausencia de ciertas enzimas y proteínas que el cuerpo produce para mantener el cuerpo en correcto funcionamiento como lo es el Síndrome de Hunter [1].

Es por ello que el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) y los departamentos de Química, Microbiología y Electrónica de la Pontificia Universidad Javeriana han desarrollado proyectos de investigación para la producción de recombinantes como modelos de terapia de reemplazo de las enzimas que producen las alteraciones previamente mencionadas.

Para facilitar la producción de enzimas y proteínas se utiliza un Bioreactor de referencia Bioengineering KLF 2000 (Figura 1 A) que mantiene un ambiente de condiciones controladas de temperatura, concentración de oxígeno, PH, agitación y metanol. La supervisión de estas variables se realiza con el software *Biolog* de Bioengineering, mediante una interfaz gráfica en la cual se pueden observar los datos de las últimas cuatro horas de proceso para posteriormente ser almacenados en archivos de texto plano. Este software no ofrece la posibilidad de presentar alarmas por lo que los usuarios del dispositivo no son informados de los eventos de interés.

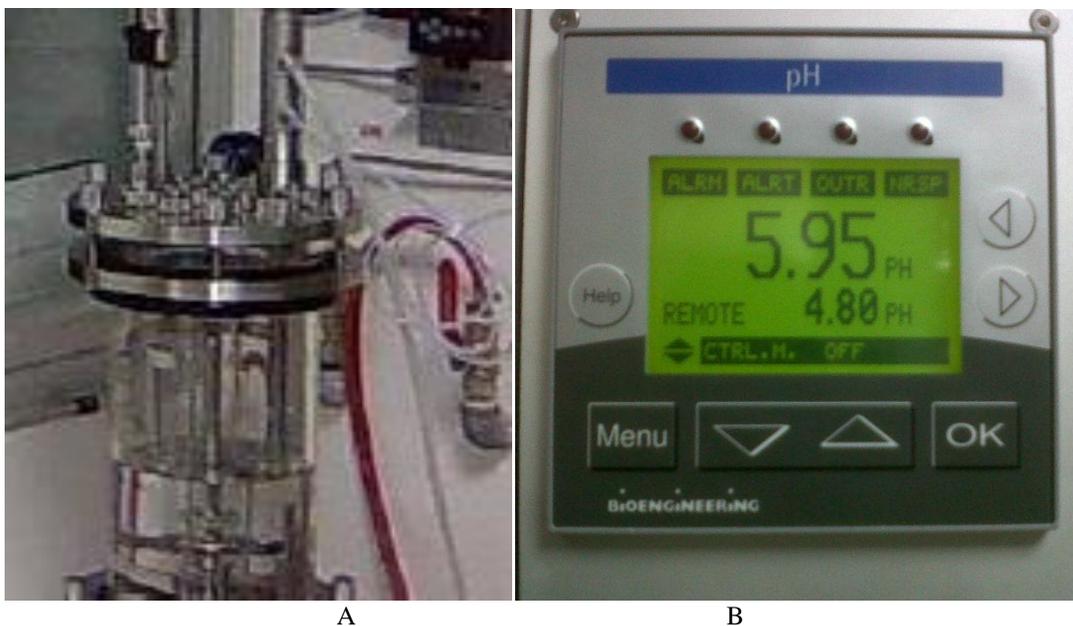


Figura 1. A) Bioreactor. B) Display para controlar el PH

Por otro lado, el sistema de control del biorreactor es configurable mediante varios displays que se encargan de mantener cada variable de interés dentro de los rangos especificados por el usuario (Figura 1 B).

Los usuarios del laboratorio han expresado que actualmente realizan turnos rotativos para verificar el adecuado funcionamiento del biorreactor así como la pérdida de información relevante y falta de seguimiento al proceso debido a la poca cantidad de datos que pueden almacenar. Ante estas circunstancias, se ha visto la necesidad de diseñar un sistema supervisorio que cuente con las siguientes características:

- Un sistema de alertas adecuado que informe de los eventos de mayor relevancia para evitar problemas con el seguimiento de las señales del proceso (ph, metanol, temperatura, espuma, oxígeno disuelto, presión agitación etc).
- Centralización de información por medio de base de datos para evitar pérdidas de información.
- Interfaz gráfica amigable que muestre el comportamiento real de la planta y que permita un fácil manejo del sistema por parte del usuario.

Actualmente se cuenta con un *Controlador Autónomo Programable* (PAC por sus siglas en inglés) de referencia NI CRIO realizando el control solamente del metanol [2] con su respectiva interfaz gráfica desarrollada en LabVIEW.

En el año 2011 el proyecto de grado “Sistema Scada para un Bioreactor [3]” fue planteado y desarrollado para resolver las falencias del equipo controlador del Bioreactor y el software *Biolog*. Como parte de dicho proyecto, se desarrolló una interfaz gráfica que presenta alarmas, curvas de comportamiento de las variables de interés y adicionalmente muestra reportes resolviendo de alguna manera la administración de datos. Adicionalmente, se extrajeron los datos del controlador mediante señales analógicas de 4-20 mA y se llevaron a un equipo de adquisición de datos modular de referencia CDAQ 9172 (del fabricante *National Instruments*) con los módulos de entrada NI9203 y salidas NI9265, los cuales no ofrecían mayor robustez ni control autónomo.

Para que el sistema funcione debe estar conectado al PC y así realizar las tareas de adquisición, control y almacenamiento de datos; es decir, que si por alguna razón el computador sufre alguna falla o se encuentra ocupado (o inclusive bloqueado) por otra aplicación, la ejecución del programa del biorreactor pasaría a un segundo plano y se perdería información importante asociada al crecimiento de la proteína.

Como parte de la nueva solución propuesta se aprovechan las características del PAC COMPACT-RIO propiedad de la universidad debido a que ofrece control embebido, velocidad en ejecución de estrategias de control, almacenamiento y procesamiento de información sin necesidad de depender de otro dispositivo; otorgando así un mayor rendimiento y confiabilidad al proceso de crecimiento de la enzima. Inicialmente dicho PAC fue diseñado para control industrial pero dadas las capacidades que ofrece el software

de programación LabVIEW, el equipo se convierte en una plataforma ideal para la implementación del control supervisorio y adquisición de datos de variables que exigen tiempos de respuesta y monitoreo permanente, como es el caso concreto de esta aplicación.

Otro punto importante de la nueva solución es la implementación de una nueva arquitectura de aplicación que permite la centralización del control de variables, el almacenamiento adecuado de la información del proceso con bases de datos para su posterior consulta a través de reportes y la renovación de la interfaz gráfica; todas necesidades manifestadas por los usuarios.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Desarrollar el sistema de control supervisorio de un bioreactor para la producción de enzimas humanas utilizando un PAC (Controlador Automata Programable) como interfaz de control y centralización de información.

### **ESPECÍFICOS**

- Capturar, presentar y registrar las señales de oxígeno disuelto, metanol, pH, temperatura y agitación.
- Manipular las señales de referencia de agitación, flujo de aire, temperatura, flujo de metanol, oxígeno disuelto y PH.
- Diseñar una interfaz gráfica que facilite al usuario la visualización de todas las variables de interés dentro o fuera del laboratorio y que permita generar alarmas, almacenar datos, generar reportes.

# Capítulo 1

## Descripción del hardware

### 1.1 Especificaciones Generales

El software seleccionado para implementar la interfaz gráfica es LabVIEW (del fabricante *National Instruments*), el cual permite realizar las siguientes tareas:

- Adquisición de datos de múltiples variables en tiempo real.
- Visualización de señales de interés y alarmas.
- Reporte de situaciones críticas del sistema por medio de correo electrónico, ventanas emergentes y sonidos de notificación.
- Generación de reportes históricos de todas las señales del cultivo.
- Almacenamiento de los datos del cultivo directamente sobre la base de datos.

### 1.2 Biorreactor

El Biorreactor debe mantener el ambiente propicio y ciertas condiciones para optimizar el proceso de crecimiento de las enzimas con los siguientes parámetros:

- Biorreactor Bioengineering KLF2000 3.7L
- Volumen del cultivo: 1.6 – 2.0L
- Rango de medición de concentración de metanol: 0.1% v/v - 3% v/v
- Temperatura de operación (cultivo): 28°C +/- 0.1°C
- Presión de operación en el biorreactor: 0barg – 1.5barg.
- Tiempo de crecimiento de enzimas: 1 semana.
- Tiempos de respuesta de sonda de oxígeno: 80 segundos.
- Tiempos de respuesta del resto de la instrumentación: entre 5 a 10 segundos.



Figura 2. Biorreactor.

## 1.3 Instrumentación

El Biorreactor está compuesto por 7 controladores entre los que se incluyen: pH, Agitación, Temperatura, Espuma, Oxígeno Disuelto y Metanol. Los 6 primeros controladores cuentan con dos partes principales un módulo de *display* una unidad de control llamada IFM (Intelligent Front Module) [6], el sensor asociado a la variable y sus respectivos actuadores. Adicionalmente cuenta con sensor de presión y de concentración de gases, estos últimos no están conectados al biorreactor pero si diseñado dentro de la solución presentada en este proyecto.

A continuación se describen las características generales de cada controlador:

### 1.3.1. Controlador de pH

Permite regular la cantidad de ácidos y soluciones alcalinas que son agregadas al cultivo por parte de 2 (dos) bombas peristálticas con el fin de mantener ciertos niveles de pH.

También cuenta con un transmisor de pH con las siguientes características:

- Rango de pH: 0-14 pH
- Precisión Relativa: +/- 0.01 pH
- Salida análoga de 4-20mA
- Temperatura de Operación: 0-150° C



Figura 3. Display controlador de pH

### 1.3.2 Controlador de Agitación

Se encarga de mantener la mezcla equilibrada para aumentar la tasa de transferencia de oxígeno e igualar la temperatura, pH y concentración de nutrientes dentro del ambiente de cultivo. Posee un motor de 0 – 1500 RPM con protección de sobre corriente y sobrecarga.



Figura 4. Display control de agitación

### 1.3.4 Controlador de Temperatura

Su propósito es mantener los niveles de temperatura adecuados para el crecimiento de la proteína. Cuenta con división de calentamiento producido por una resistencia y enfriamiento con un intercambiador de calor. Adicional utiliza un sensor de temperatura PT-100 con las siguientes características:

- Rango de Temperatura: 0-150 °C
- Salida análoga : 3,5-28mA



Figura 5. Display controlador de temperatura.

### 1.3.5 Controlador de Espuma

Realiza un control de tipo On/Off y está diseñado para regular la cantidad de espuma inyectando antiespumante con una bomba peristáltica al cultivo con el fin de que no se le reduzca el espacio de crecimiento a la Biomasa. Posee un sensor compuesto por dos electrodos que reaccionan al estar en contacto con la espuma.



Figura 6. Display controlador de espuma

### 1.3.6 Controlador de Oxígeno Disuelto

Regula la cantidad de oxígeno agregado al cultivo junto con un medidor de Flujo Sierra Smart Trac. Posee un transmisor de Oxígeno Disuelto de 0-200nA de señal de entrada y 4-20mA de señal de salida. Es importante mencionar que este sensor siempre es calibrado antes de realizar las pruebas de cultivo porque por lo general no siempre se controla el crecimiento de una proteína en particular.



Figura 7. Display controlador Oxígeno Disuelto

### 1.3.7 Controlador de Metanol

Gradúa la cantidad de metanol que debe ser agregada al Biorreactor utilizando una sonda de pervaporación de las siguientes características [2]:

- Rango de medición: 0.1 – 3.0% v/v
- Precisión: 0,025% v/v
- Desviación máxima de la lectura de concentración: • 0,3% v/v
- Rango de Temperatura: 10 – 143°C
- Presión máxima: 2barg

Este controlador se activa en el momento justo en que el crecimiento del microorganismo está listo para iniciar la etapa de producción de proteína.



Figura 8. Controlador de Flujo de Aire sintético y Bomba peristáltica.

### 1.3.8 Sensor de Presión

Este equipo de Marca *Danfoss* posee una salida de 4-20mA con una cobertura de presión entre 0-2,5 Bares (Figura 9).



Figura 9. Sensor de Presión

## 1.4 Sistema de control supervisorio

Tal y como se describió anteriormente, para el sistema de monitoreo se utilizará un controlador industrial marca *National Instruments*, cuyo software será desarrollado en LabVIEW, el cual permite obtener y manipular todas las variables que intervienen el proceso de crecimiento del microorganismo. Algunas de sus características son:

- Controlador de automatización programable: *CompactRIO 9022* con Chasis 9114
- Módulo de entrada para resistencia NI 9219: 0-10k $\Omega$ , 24 Bits, Tasa de muestreo de 100S/s
- Módulo de entradas NI 9208: • +/- 20mA, 16 entradas de alta resolución.
- 2 Módulos de salida en corriente NI 9265: • +/- 20mA, 16 bits, tasa de muestreo de 100k S/s
- Voltaje de alimentación: 24 V

Es importante mencionar que la conexión de las señales al controlador se realiza mediante la conexión de borneras.



Figura 10. CompactRIO.

## 1.5 Interfaz Gráfica Local

La solución incluirá monitoreo local en el laboratorio, por lo que para la presentación de la información, base de datos y manejo de históricos en sitio se empleará un computador con las siguientes características:

- Windows 7
- 4 Gb de memoria RAM
- 30Gb de espacio libre en el disco duro
- Conexión a Internet ya sea por cable de red o Wi-Fi
- LabVIEW 2011 con los módulos de DSC, FPGA, Real Time, Application Builder.
- 1 puerto Ethernet extra o con Hub.

## Capítulo 2

### Arquitectura de la aplicación

Con el boom de la tecnología y el desarrollo de nuevas técnicas de programación se ha evidenciado la necesidad de mejorar los procesos de diseño para determinados tipos de aplicaciones dentro del área de la investigación. Es por ello que hoy por hoy se emplea el término “aplicaciones en tiempo real” frecuentemente para procesos como diseño de automóviles (sistemas de frenado), sistemas de navegación, control de motores, monitoreo de cultivos, entre otros.

Tales aplicaciones demandan tiempos de respuesta y condiciones específicas para un correcto funcionamiento, por otro lado también exigen el diseño de interfaces gráficas que permitan al usuario entender con facilidad los procesos, así como generar reportes, monitorear alarmas y eventos con el fin de realizar una gestión adecuada de la información.

A continuación se define la arquitectura seleccionada para el sistema de monitoreo de variables diseñado desde el entendimiento de la operación del cultivo hasta el desarrollo de la interfaz gráfica.

#### 2.1 Operación general del cultivo

Un proceso normal de cultivo inicia con la rutina de esterilización del recipiente y la solución. En el Biorreactor se agregan 2,7 litros de una solución de glicerol para que tiempo después se incremente la temperatura hasta los 95°C. En dicho estado se procede a cerrar la válvula del intercambiador de calor para que aumente la temperatura hasta los 120°C en donde permanecerá alrededor de unos 15 minutos. Terminado este tiempo se abre la válvula para que la temperatura baje nuevamente hasta 95°C y así posteriormente continuará descendiendo hasta la temperatura que el microorganismo exija para ser agregado a la solución. Es importante mencionar que este proceso dura alrededor de 2 horas y durante este tiempo se procede a calibrar las sondas de pH y Oxígeno Disuelto (OD) con el propósito de garantizar la fiabilidad de las señales tomadas.

Cuando la temperatura baja alrededor de los 28°C el microorganismo es agregado a la solución de glicerol. Acto seguido los controladores de OD, pH, temperatura y agitación se configuran de manera que garanticen un ambiente propicio, condiciones óptimas y controladas para el crecimiento del microorganismo. Cada 8 horas se toman muestras del cultivo para evaluar el progreso del microorganismo y cuando éste alcanza el crecimiento adecuado se acciona el controlador de Metanol que inyecta dicho material a la mezcla para inducir la producción de la proteína deseada.

Generalmente un cultivo tiene duración de 120 horas máximo y presenta cambios en las señales aproximadamente cada 3 segundos, por lo que resulta ser un proceso lento en comparación con sistemas de control de motores, monitoreo de señales de vibración etc. Al terminar el proceso se toman las muestras de Biomasa para evaluar cuánto fue el crecimiento de la misma y la cantidad de proteína obtenida en el cultivo.

## 2.2 Arquitectura de la programación (¿Tiempo real?- ¿Determinístico?)

Debido al comportamiento anteriormente descrito se propuso implementar el sistema de monitoreo dentro de un *CompactRIO* (o CRIO) al ser un hardware diseñado para aplicaciones en tiempo real, tiempos de respuesta altos y fiabilidad en el manejo de datos.

Las aplicaciones en tiempo real (ATR) son aquellas que interaccionan rápidamente con el entorno físico y responden a estímulos dentro de un plazo determinado (generalmente muy corto). La activación de estos estímulos se puede hacer de manera periódica (intervalos regulares) o aperiódica (responde a sucesos determinados) con plazos de respuesta absolutos (tiempo límite para terminar) o relativos (intervalo desde la activación).

Por otro lado una característica esencial de los sistemas en tiempo real es que se deben diferenciar en dos tipos: *Determinísticos* y *no Determinísticos*.

Los sistemas *Determinísticos* son aquellos que para cada estado y cada conjunto de entradas pueden ser determinados un único conjunto de salidas y el próximo estado del sistema. Por ejemplo sistemas de adquisición de datos, controles On/ Off, entre otros.

Los sistemas *No Determinísticos* son aquellos que por ejemplo la ejecución del cambio de estado depende del ingreso de un dato externo (módulos de entrada de usuario, temporizadores de hardware etc.) o existe concurrencia de estados en los que dos aplicaciones deben acceder a la misma instancia de código para resolver alguna rutina [7].

Aunque es claro que nuestra planta (el cultivo) no exige tiempos críticos de procesamiento de datos, ya que las señales cambian cada 3 a 5 segundos en promedio, se consideró como una ATR puesto que exige un tiempo de respuesta inmediata en momentos específicos con un alto volumen de datos y operación simultánea de los controladores.

Adicionalmente se diseñó como un sistema *Determinístico* para la adquisición de datos y el control de metanol con la implementación de loop temporizados y *No Determinísticos* para la parte de almacenamiento y envío de información hacia la base de datos ya que estas operaciones dependen de la disponibilidad del hardware y distintas aplicaciones pueden consultar la base de datos simultáneamente.

De acuerdo con lo anterior el CRIO, 3 (tres) niveles de ejecución de bloques de código (conocidos como VI, de Virtual Instrument) de forma asíncrona que son:

- La FPGA (utilizado cuando los tiempo de procesamiento son menores a 500 Hz)
- El sistema operativo en tiempo real (RTOS) SCAN MODE
- El PC host (Figura 11).

Se definió una arquitectura dedicada a sistemas SCADA con el modo de escaneo (Scan Mode) en donde se ejecutarán las rutinas de adquisición y control de metanol y comunicación externa, en conjunto con PC host, donde se encuentra la interfaz gráfica y el manejo de la base de datos (Figura 12).

La comunicación entre el Host (PC) y la tarjeta RT (CRIO en Scan Mode) se establece a través de las variables globales que ofrece el software debido a que pueden ser invocadas en cualquiera de las instancias mientras se encuentran al interior del Proyecto (VI Project).

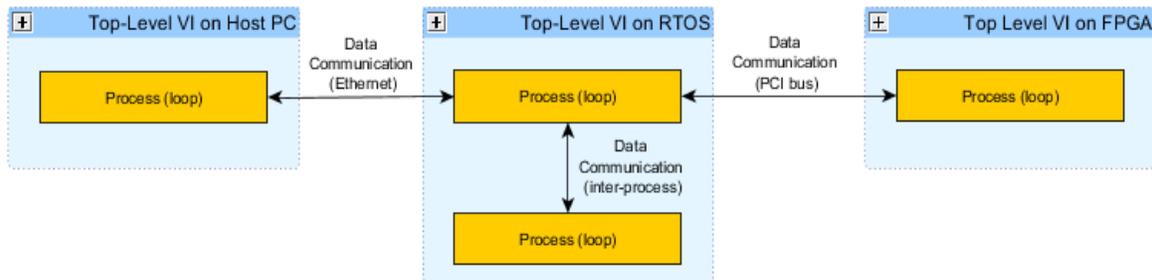


Figura 11. Componentes básicos de la arquitectura del CRIO [4].

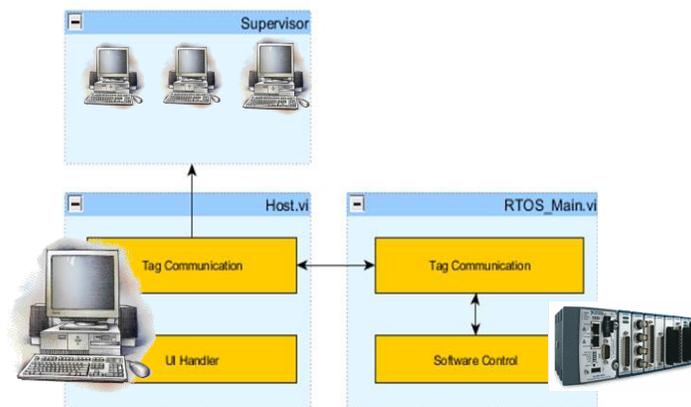


Figure 12. Arquitectura para sistemas SCADA [4].

### 2.3 Diagrama en bloques de la solución

Para el desarrollo del proyecto y dar mayor claridad a la implementación se emplearon 4 módulos, cada uno con su respectiva funcionalidad: Modulo de adquisición, Modulo de Comunicaciones, Modulo de usuario y Modulo de control (Figura 13):

Toda la arquitectura del software se encuentra y la aplicación desarrollada se encuentra en el Apéndice 5 de forma digital con el nombre de Archivos de Programación.

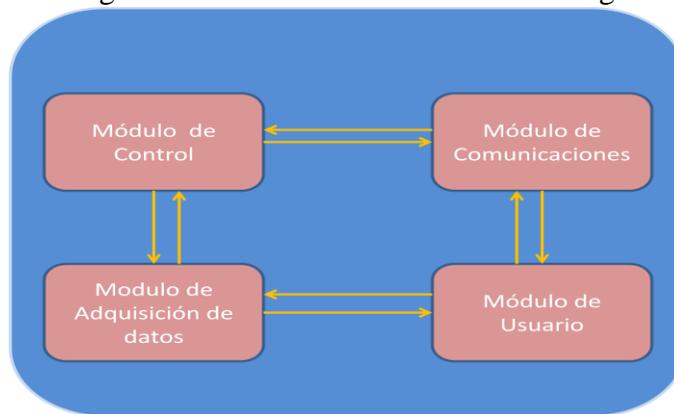


Figura 13. Diagrama de Bloques del sistema

A continuación una descripción de cada módulo:

## 2.4 Módulo de adquisición

Está desarrollado directamente sobre el controlador CRIO y permite la adquisición de todas las variables de entrada y de salida. Las señales adquiridas dentro de este módulo tienen un rango entre 4-20mA por lo que se requirió la implementación de módulos especiales con el fin de que el usuario y los controladores manejen las señales según el valor de la variable real (Figura 14).

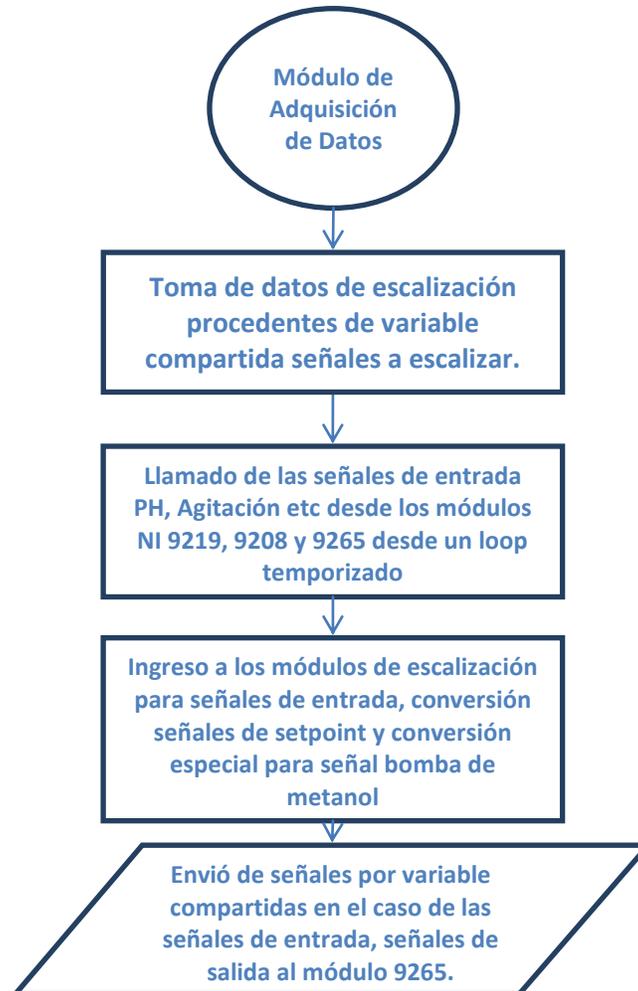


Figura 14. Diagrama de flujo módulo de adquisición de datos

### 2.4.1 Loop Determinístico

Para realizar la adquisición de manera simultánea de las más de 10 (diez) señales disponibles de entrada y salida al CRIO, se implementó un loop (bucle, ciclo) determinístico temporizado que recorre una función *case* para garantizar la escalización y conversión en un tiempo no mayor a 0,1 segundos.

Adicionalmente existe otro loop temporizado externo que garantiza la adquisición de datos de manera periódica durante cada segundo hasta que sea interrumpido por el usuario cuando finalice el cultivo (Figura 15).

Nota: Las figuras ampliadas de los Diagramas en Bloques de la programación en LabVIEW se encuentran en el Apéndice 1.

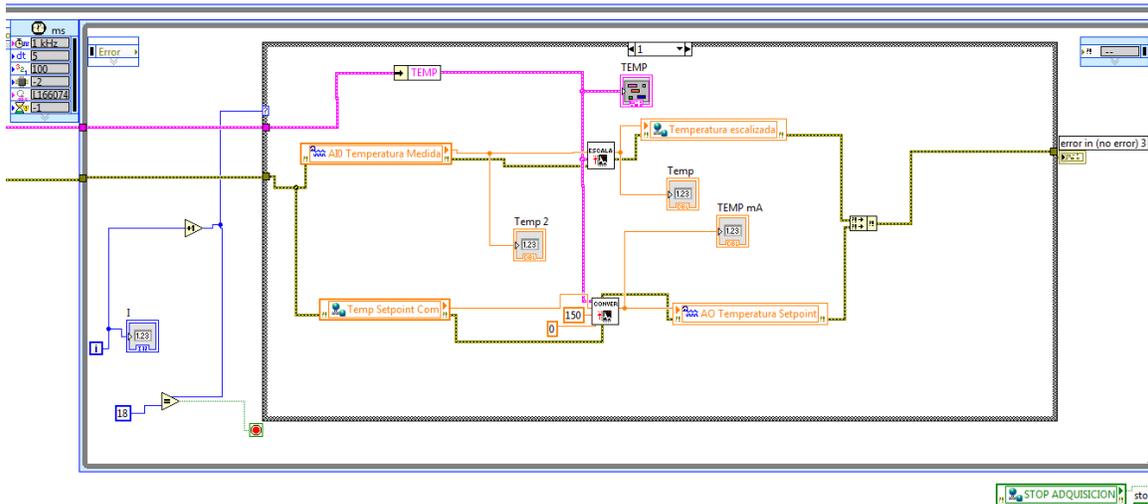


Figura 15. Loop Temporizado con el case en la posición de la señal de temperatura. También se aprecian los VI de escalización y conversión.

## 2.4.2 Escalización, conversión y escalización especial

Se realizaron 2 conjuntos de pruebas sobre todas las variables en días diferentes en cada experimento se tomaron 4 datos de cada Variable, los datos están incluidos en el Apéndice 2 (DatosEscalizacion.xlsx). Por medio de regresiones lineales se obtuvieron ecuaciones de la forma:

$$y = \text{valor de la variable}, x = \text{valor en corriente}$$

$$\text{Temperatura: } y = 9375x - 37,5 \quad [\text{Ecuación 1}]$$

$$\text{Agitación: } y = 93750x - 1845 \quad [\text{Ecuación 2}]$$

$$\text{pH: } y = 623,75x - 0,4873 \quad [\text{Ecuación 3}]$$

$$\text{Oxígeno: } y = 6250x - 25 \quad [\text{Ecuación 4}]$$

$$\text{Espuma: } y = 6,25x - 0,025 \quad [\text{Ecuación 5}]$$

$$\text{Presión: } y = 156,25x - 33,576 \quad [\text{Ecuación 6}]$$

$$\text{Flujo de Aire Sintético: } y = 62500x - 250 \quad [\text{Ecuación 7}]$$

$$\text{Control de Flujo de Aire Bio: } y = 62500x - 250 \quad [\text{Ecuación 8}]$$

En el caso de la escala de metanol (Escalización Especial) se definió una conversión entre la tasa de metanol ingresado al cultivo con respecto a la velocidad de la bomba peristáltica mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Metanol: } y = (0,0479x - 0,04) * \left(\frac{0,016}{z}\right) \quad [\text{Ecuación 9}]$$

Donde  $x$ : es el flujo de la bomba peristáltica y  $z$ : Span en RPM

(para mayor información consultar la ref [4]).

Por otra parte, en algunas pruebas realizadas dentro del laboratorio se observó que los usuarios del Biorreactor calibran algunos de los sensores y por ello las funciones lineales calculadas a veces cambiaban de pendiente, por lo que los valores escalizados no resultaban iguales o se desviaban del valor mostrado por los controladores de Bioengineering. Para atender este escenario, se diseñó un VI que permite al usuario ajustar la escalización según se requiera. Esta interfaz será descrita más adelante en el módulo de usuario.

## 2.5 Módulo de Control

El único control que se tiene implementado hasta el momento es el de metanol [4] porque los demás controladores (pH, Agitación, OD etc.) se realizan directamente sobre las unidades IFM del Bioengineering. Se proyecta que para el próximo semestre se incluirán nuevos controladores por lo que se podría contemplar la idea de mejorar la aplicación descargada en el controlador en donde se ejecuta paralelamente la adquisición con el control de metanol cada uno con su *Timed Loop* acorde al patrón de desarrollo productor-consumidor con variables compartidas.

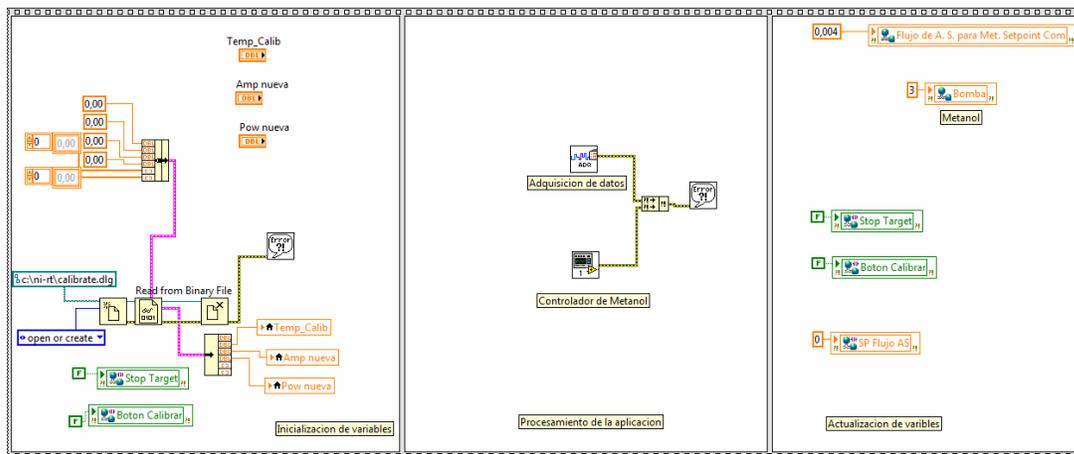


Figura 16 A) Rutina de ejecución en el target de la adquisición y control de metanol.

### 2.5.1 Control de metanol

Anteriormente este controlador estaba configurado dentro de un *While Loop* sencillo, pero debido al tipo de aplicación que se desarrolló en este proyecto se modificó el tipo de ciclo por un loop temporizado (*Timed Loop*) a 100 ms ya que

mejora la ejecución del controlador ON/ OFF diseñado por Andrés Nova [2] y se reubicó la escalización de la señal de setpoint (escalización especial).

Las rutinas de calibración de la sonda de Metanol y el CRI0 no fueron modificadas y se ejecutan de manera paralela a la adquisición.

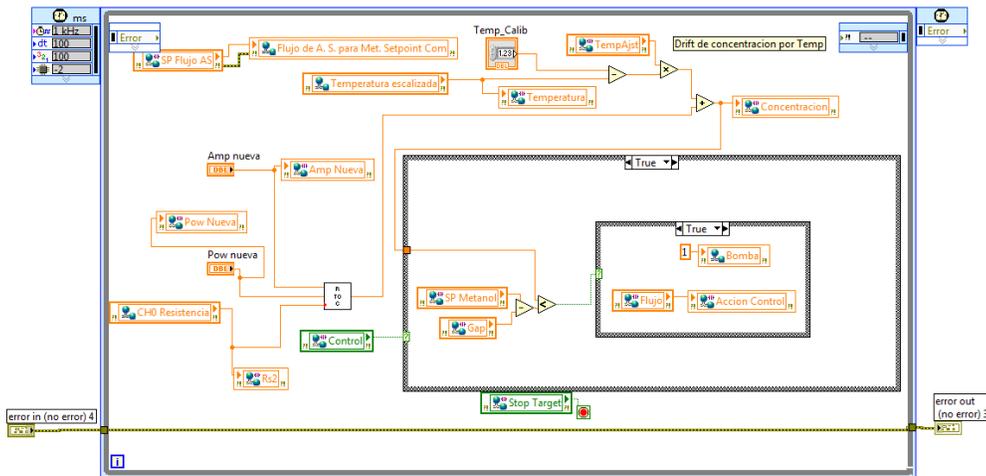


Figura 16 B) Rutina de ejecución del control de metanol.

## 2.6 Módulo de comunicaciones

Como tal este módulo no está consignado en un solo VI porque es empleado constantemente por la interfaz de usuario y de alarmas.

### 2.6.1 Monitoreo remoto

Inicialmente en el proyecto se planteó la idea de implementar monitoreo remoto con el fin de que los usuarios tuvieran un mayor control sobre el cultivo en la eventualidad de que el personal se ausentara del laboratorio. En esta etapa del proyecto no pudo implementarse debido a que es necesario emplear una IP pública (salida a internet) para habilitar los paneles remotos que ofrece la herramienta de programación. Se deja como una posibilidad de desarrollo posterior para mejora de la plataforma el poder habilitar dicha cualidad.

El manejo de esta asignación de dirección IP publica está a cargo del departamento de Tecnologías de la información de la Universidad tramite que no se alcanzo a realizar.

### 2.6.2 Mensajes de correo electrónico

Los mensajes de correo electrónico son configurados mediante el toolkit de internet de LabVIEW con el protocolo SMTP para el envío de correos electrónicos. Es necesario configurar el servidor de correo saliente, el puerto, dirección de correo y contraseña. La ejecución de esta cualidad del programa se realiza desde el apartado

de alarmas. En la Figura 17 se observa el diagrama de funcionamiento del módulo configuración del módulo (Figura 17).

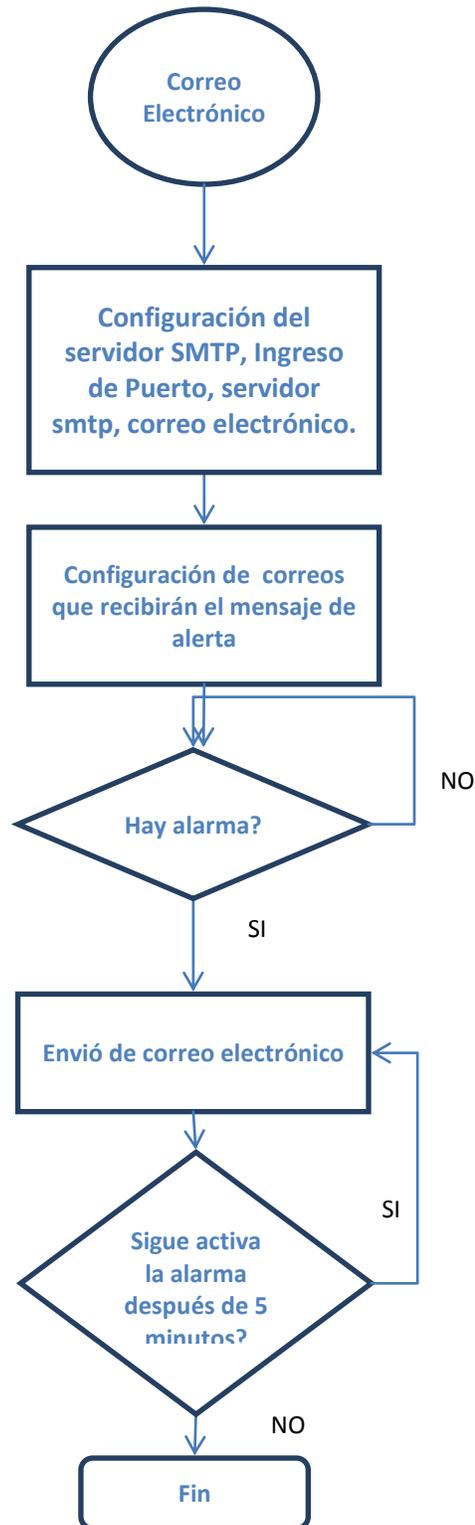


Figura 17. Diagrama en bloques lógica correo electrónico

Este VI está implementado en el módulo de Alarmas debido a que depende del tipo de alarma si el mensaje de correo es enviado o no al usuario.

Nota: Los antivirus por lo general bloquean la salida de correos de aplicaciones por el puerto 587, razón por la cual hay que asegurar el permiso (excepción) de salida de correos por este puerto.

### 2.6.3 Base de datos y reportes en Excel

Como inicialmente el almacenamiento de las señales se estaba realizando en los archivos de texto plano se atendió la necesidad de hacer uso de una estructura mejor en cuanto al almacenamiento de información apoyándose en bases de datos.

Aprovechando que el laboratorio cuenta con una licencia completa de Microsoft se selecciono la base de datos Access en su versión 2007 (proveedor de conexión ODBC: OLE DB Provider) por su facilidad de manipulación y ya que la administración de la misma se realizara por un solo usuario se cumplían con las necesidades inmediatas de proyecto. La conexión desde LabVIEW a las tablas de la base de datos es a través de un archivo UDL (Universal Data Links). Este UDL [6] puede ser creado de varias formas y contiene la ruta a la que debe apuntar el Consumidor OLE DB (empleado desde la aplicación de LabVIEW) para acceder a los datos.

La base de datos implementada contiene tablas para el registro y consulta de alarmas, constantes, datos para calibración, resultados de cultivo (Figura 18).

The screenshot shows a Microsoft Access database window titled 'BIOREACTOR : Base de datos (Formato de archivo de Access 2002 - 2003)'. The 'Datos' ribbon is active, showing a table named 'RESULTADOS\_CULTIVOS'. The table has the following columns: FECHA, SETPOINTTEMP, TEMP, SETPOINTPH, PH, SETPOINTAGITACION, AGITACION, SETPOINTFAS, FAS, SETPOINTCONTROLABIO, and CONTROLABIO. The data rows show measurements taken on 19/04/2014 and 05/02/2014.

FECHA	SETPOINTTEMP	TEMP	SETPOINTPH	PH	SETPOINTAGITACION	AGITACION	SETPOINTFAS	FAS	SETPOINTCONTROLABIO	CONTROLABIO
19/04/2014 12:00:01 p.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 12:00:00 p.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:59:59 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:59:58 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:59:43 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:22 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:21 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:20 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:19 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:18 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:17 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:58:16 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
19/04/2014 11:56:52 a.m.	0	22	0	5	0	0	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:51 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:47 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:42 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:37 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:32 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:27 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:23 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:18 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:13 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:08 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:50:03 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:59 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0

Figura 18. Tablas creadas en la base de datos.

Después de la implementación de la base de datos, se realizó una plantilla en Excel para cada una de las tablas de interés a las que se les puede generar un reporte según elija el usuario por medio de la interfaz gráfica (Figura 19).

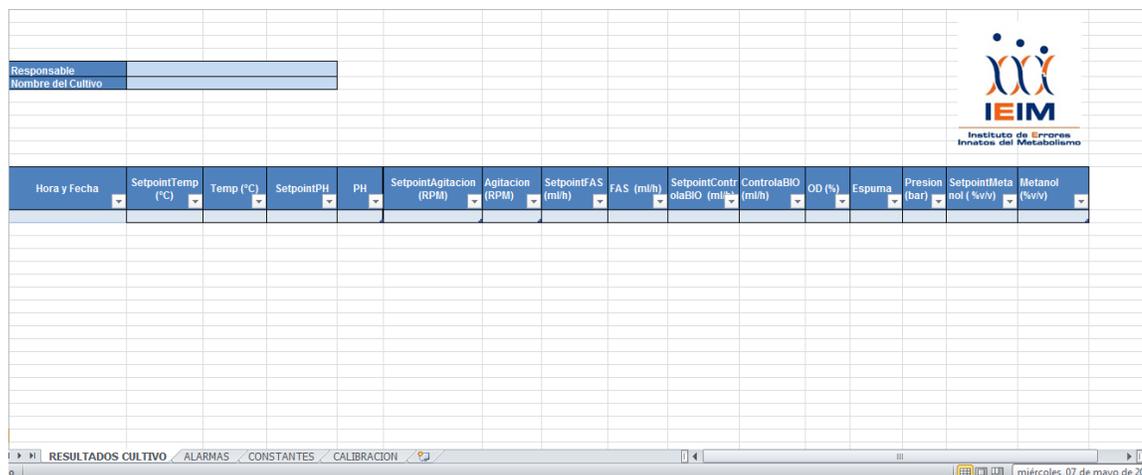


Figura 19. Modelo de la plantilla de reportes de cultivos, alarmas, constantes y calibración.

## 2.7 Módulo de usuario

La interfaz gráfica le permite al personal del Biorreactor interactuar con toda la plataforma configurando setpoints, escalas, generando reportes y monitoreando alarmas.

A continuación se muestra una descripción completa de las principales partes del sistema:

### 2.7.1 Operación general

La interfaz de usuario, necesaria para manipular el sistema de medición y control, se desarrolló en LabVIEW tal y como se describe en la Figura 20.

Se compone de tres grupos de rutinas principales:

- Adquisición de señales y registro de información a la base de datos.
- Grupo de rutinas de control de metanol, de calibración de la sonda de pervaporación y de evaluación de alarmas.
- Extracción de información desde la base de datos (Figura 21).

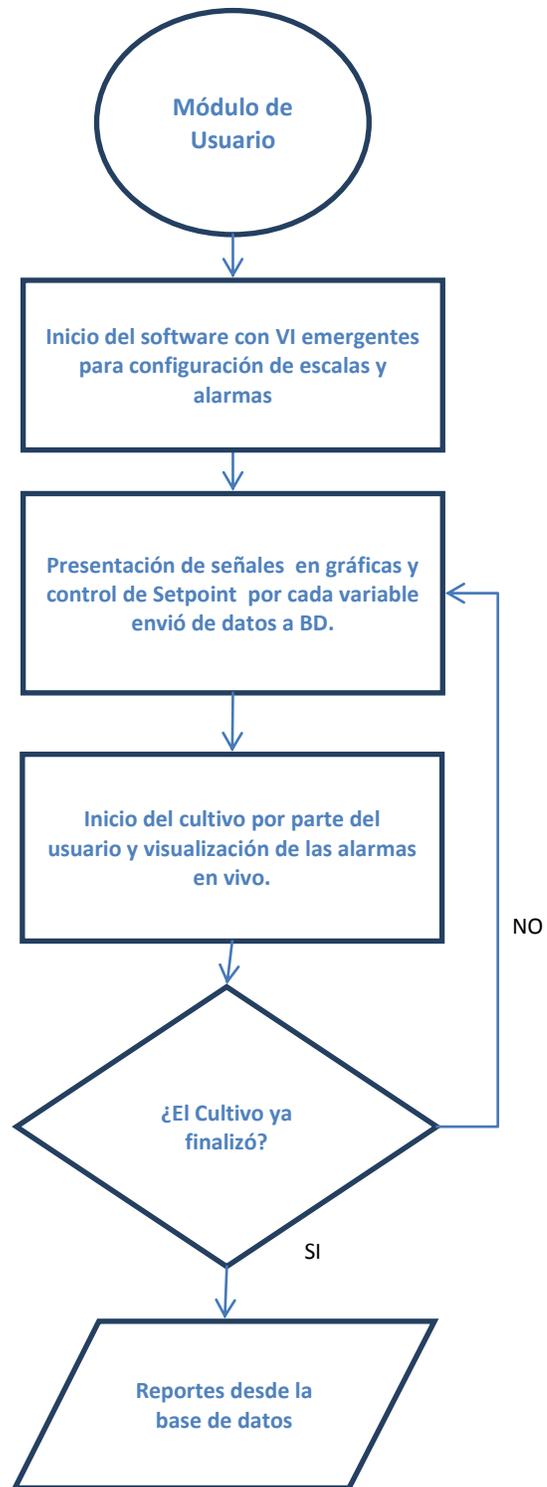


Figura 20. Diagrama de flujo. Funcionamiento general de la interfaz gráfica.



Figura 21. Panel frontal de la interfaz gráfica.

## 2.7.2 Interfaz de calibración

El biorreactor tiene como función principal servir para la producción de diferentes tipos de proteínas con muchas clases de microorganismos por lo que no todos los cultivos tienen las mismas condiciones; es por ello que se diseñó una rutina para permitir al usuario configurar la escalización de las señales de pH, OD según lo requiera y definir los rangos de valores para las alarmas asociadas a cada tipo de variable (Figura 22).

La interfaz cuenta con una serie de arreglos de controles números divididos en 4 campos:

1. Selección de Variable: Incluye 3 controles: una lista desplegable donde podrá elegir si se desea recalibrar los valores de alarma, OD o pH, otro de tipo botón para detener la calibración y finalmente otro botón en el que se realiza el ajuste de la calibración. Para poder realizar cambios en cada módulo, el usuario siempre debe seleccionar los valores, luego ajustar los valores dependiendo del módulo y finalmente oprimir el botón de realizar ajuste para asegurar el registro de los cambios en la base de datos.

2. Configuración rangos de Alarmas: Consta de varios controles numéricos que están asociados a los valores máximos y mínimos de las variables del Biorreactor para la generación de alarmas. Al igual que la sección anterior, cuando el usuario termine de realizar cambios en este campo siempre debe oprimir el botón de realizar ajuste, de lo contrario se perderán los cambios.
3. Configuración de valores OD: Cuenta con controles numéricos en los que se digitan los valores máximo o mínimo de OD y su respectivo valor en corriente mostrado en el numeral 5. El botón *Toma de Cor Max OD o Min OD* le permitirá fijar el valor deseado según la calibración realizada en el laboratorio.
4. Configuración de Valores pH: Esta pantalla cuenta con controles numéricos en los que se digita el valor máximo de pH o mínimo de pH y su valor correspondiente en corriente mostrado en el numeral 5. El botón *Toma de Cor Max PH o Min PH* le permitirá fijar el valor deseado según la calibración hecha en laboratorio.
5. Visualización de corriente: en este campo se visualizara la corriente medida por el Modulo 9265 y que es equivalente al valor de pH tomado del *Display* del Controlador de Bioengineering

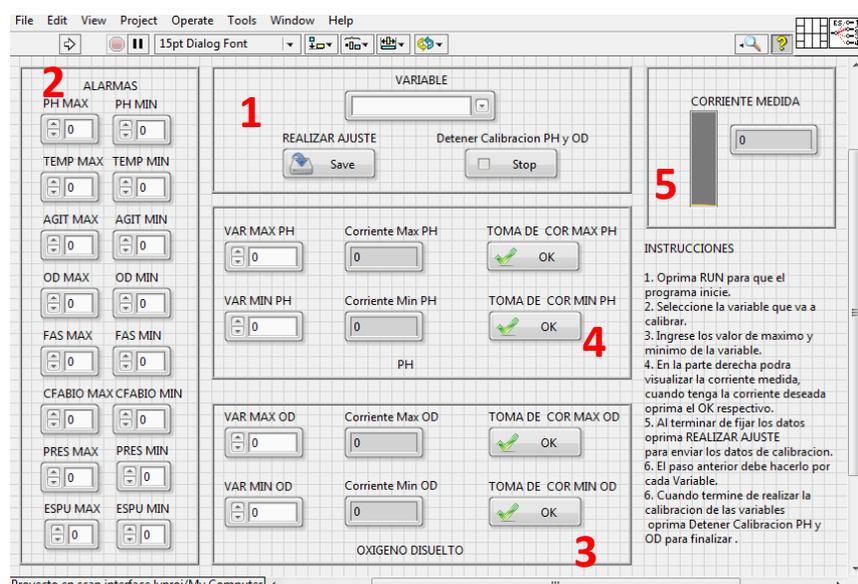


Figura 22. Panel frontal interfaz de calibración, 1. Selección de Variable, 2. Configuración de rangos alarmas, 3. Configuración valores Oxígeno Disuelto 4. Configuración Valores pH 5. Visualización de Corriente.

### 2.7.3 Interfaz de visualización de señales y setpoint

Está compuesto por controles tipo pestaña (Tab) que incluyen todas las posibles señales de entrada del sistema para que los usuarios del laboratorio puedan visualizar una a una el comportamiento de las mismas (Figura 23). Cada pestaña se encuentra la señal asociada (temperatura, agitación, metanol, entre otras) con su respectivo setpoint, indicadores de alarmas altas o bajas y un botón que controla la activación del controlador (Figura 24).

Adicionalmente en la parte superior, los usuarios pueden ingresar el nombre del responsable del cultivo junto con el nombre del cultivo para que se lleve un registro los usuarios que tienen acceso al Biorreactor (Figura 23).

Por otro lado, cuenta con un botón de inicio de cultivo y control numérico para especificar el tiempo de muestreo al que se enviará la información a la base de datos (Figura 21).

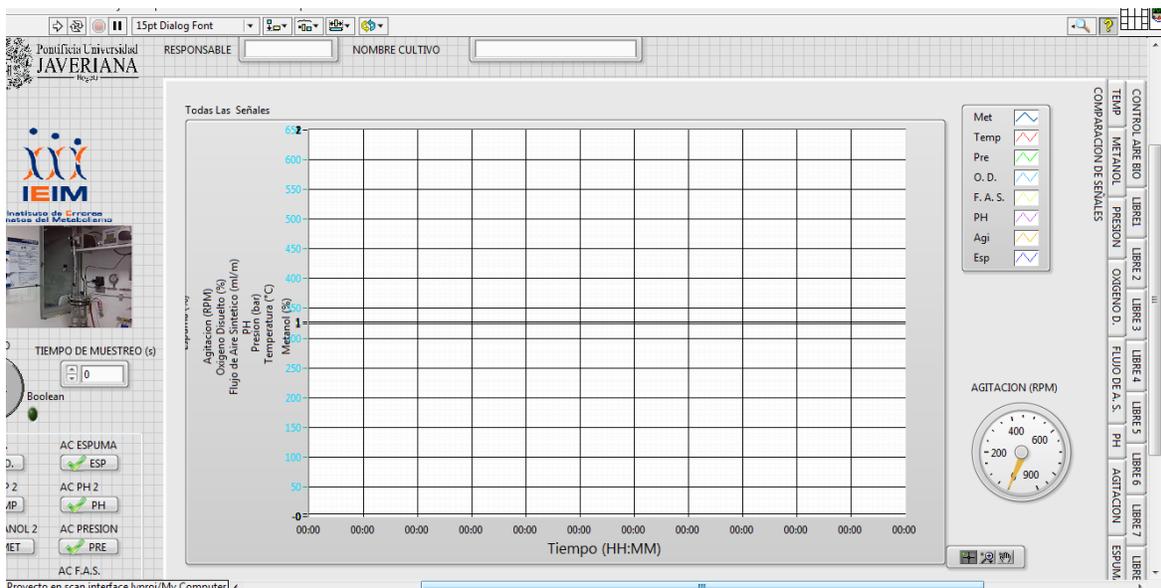


Figura 23. Panel frontal interfaz de VI Principal campo de visualización de variables.

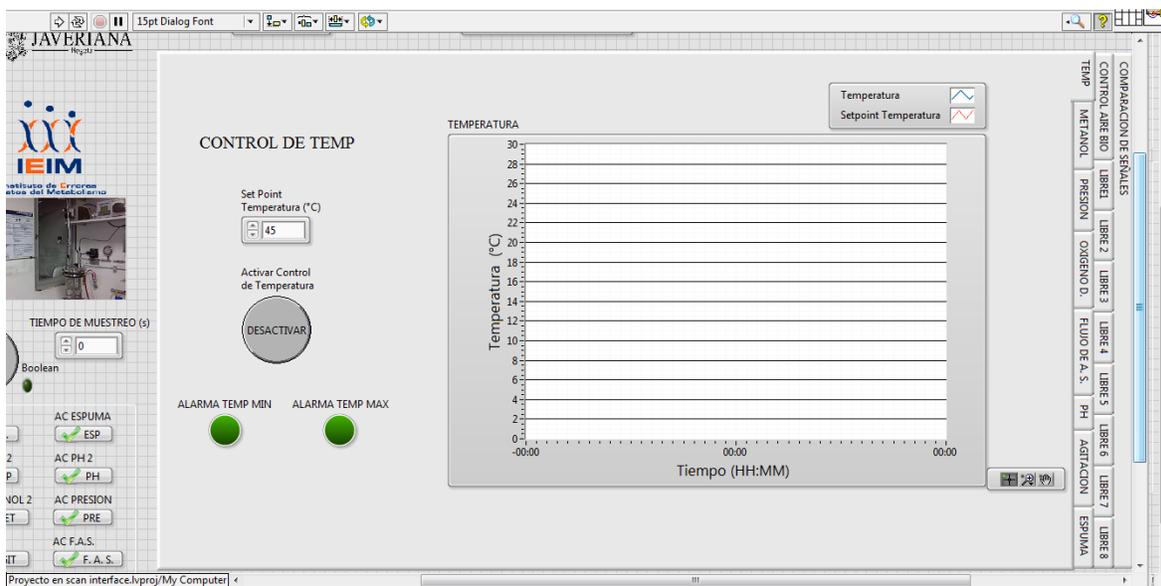


Figura 24. Panel frontal interfaz de VI Principal tab de señal de temperatura.

## 2.7.4 Interfaz de alarmas

Las alarmas que se generen durante el funcionamiento del sistema están controladas por un loop que funciona en paralelo con el VI principal donde se almacenan los registros en la base de datos. El funcionamiento del mismo se resume en el diagrama de la figura 25.

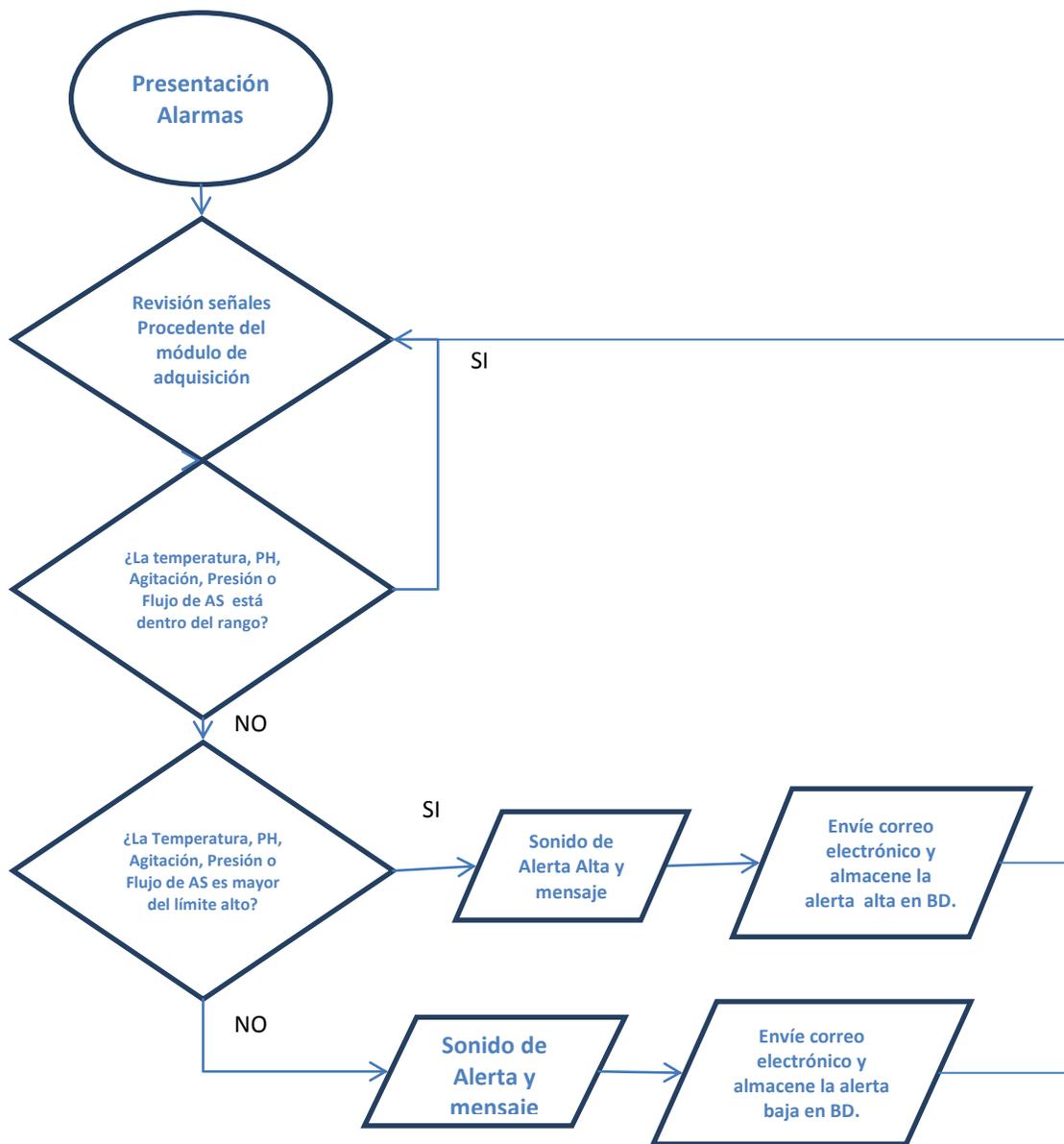


Figura 25. Diagrama de flujo del módulo de alarmas.

Tal y como ilustra el anterior diagrama, cuando se detecta una condición de alarma, el sistema establece de qué tipo es y procede a enviar una alerta visual y sonora al PC (Figura 26). También envía un correo electrónico a la persona a cargo para que esté pendiente del cultivo en caso de que no esté disponible en el laboratorio. Este correo electrónico se ingresa en el módulo de historial de alarmas en la pantalla continua a la interfaz donde se visualizan las variables, configuran setpoint, entre otras tareas.

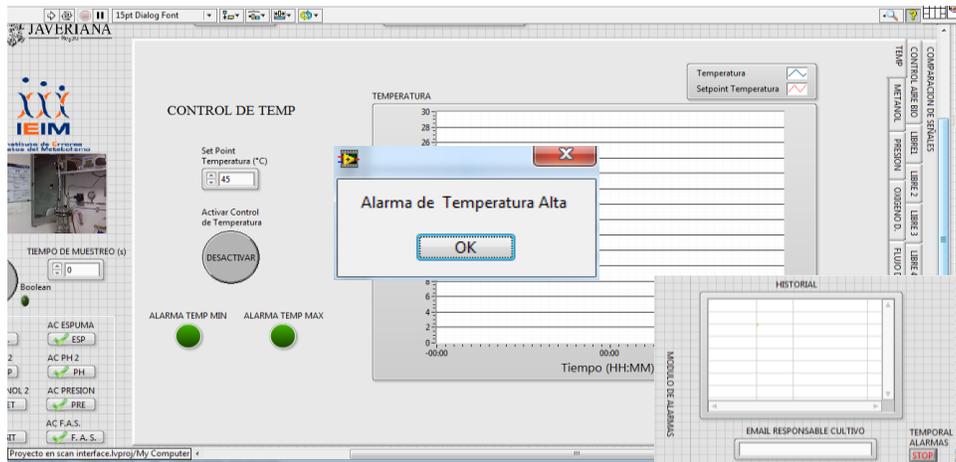


Figura 26. Alerta Visual y mensaje al historial de la pantalla principal.

### 2.7.5 Interfaz de reportes

Está compuesta por controles de fecha, listas desplegables del tipo de tabla a exportar, los tipos de señales y un botón para generar el reporte en Excel (Figura 28). El funcionamiento general del módulo se referencia en el diagrama de la Figura 27.

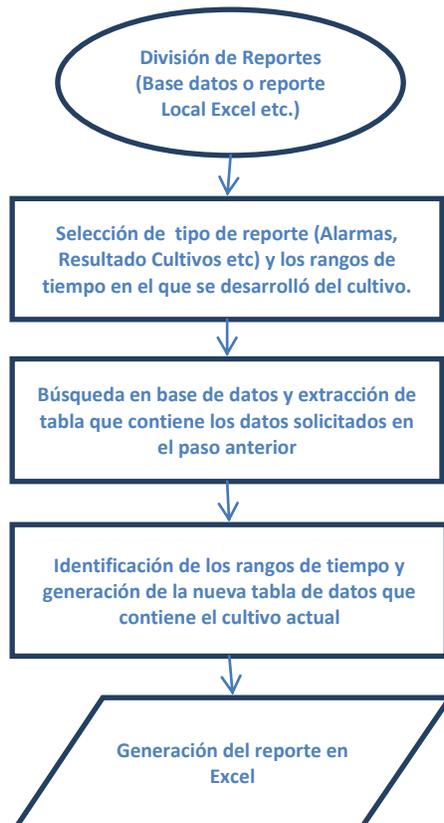


Figura 27. Diagrama de flujo del funcionamiento del módulo.



Figura 28. Panel frontal del módulo de reportes.

## Capítulo 3

### Pruebas de calidad y diseño

Durante 3 días se realizaron diferentes pruebas en las que se contemplaba el ajuste de señales de setpoint a la planta, el registro de cada señal en la interfaz principal, la generación de alarmas y el adecuado almacenamiento de información a la base de datos. Se han realizado pruebas parciales y capacitación “On Hands” de un operador del laboratorio. No hubo posibilidades de realizar la prueba en un cultivo completo. Se incluye un Manual de Usuario Apéndice 6. A continuación se describen algunos de los procedimientos realizados.

### Prueba de señales de setpoint y escalización de señales de entrada

Durante un día se conectó el CompactRIO a la planta y se establecieron distintos valores de setpoint (agitación, temperatura, pH, metanol, OD) para observar el cambio en cada señal. A continuación las imágenes muestran los resultados obtenidos.

Se presenta la información grafica de las variables. Los valores numéricos correspondientes se encuentran en el archivo BIORREACTOR.mdb de la base de datos. Anexo 2

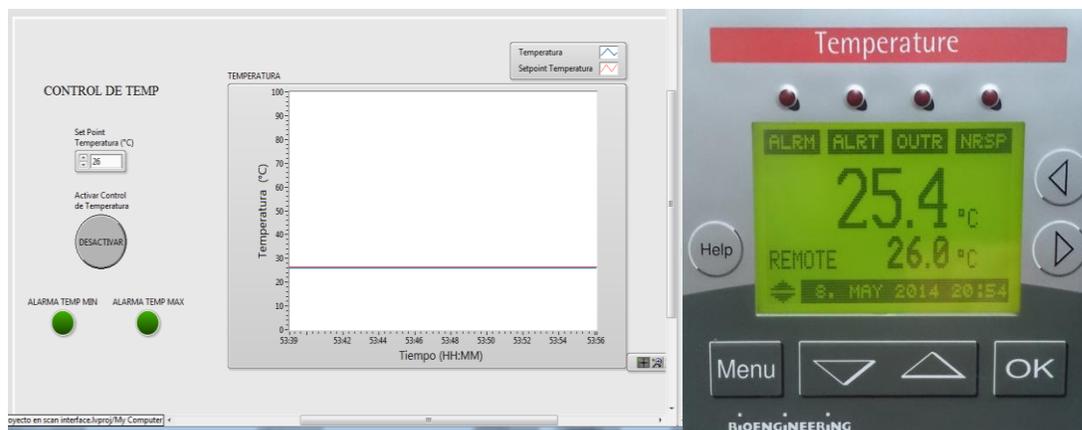


Figura 29. Comparación Display Bioengineering con Panel frontal del módulo de temperatura de LabVIEW con setpoint de 26.

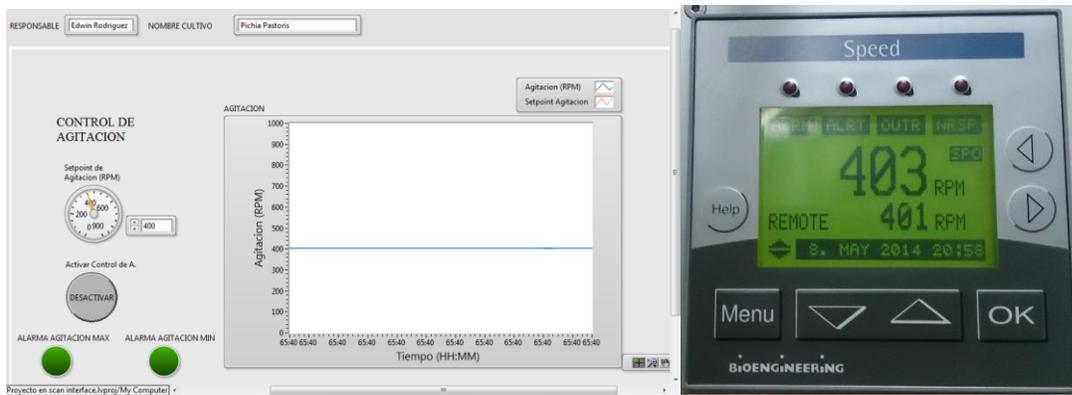


Figura 30. Comparación Display Bioengineering con Panel frontal del módulo de Agitación de LabVIEW con setpoint de 401.

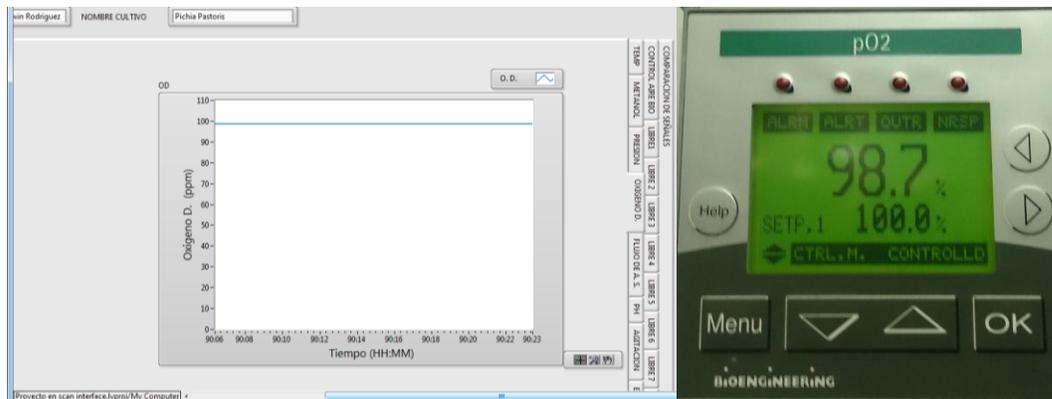


Figura 31. Comparación Display Bioengineering con Panel frontal del módulo de Oxígeno disuelto de LabVIEW con setpoint de 98.7.

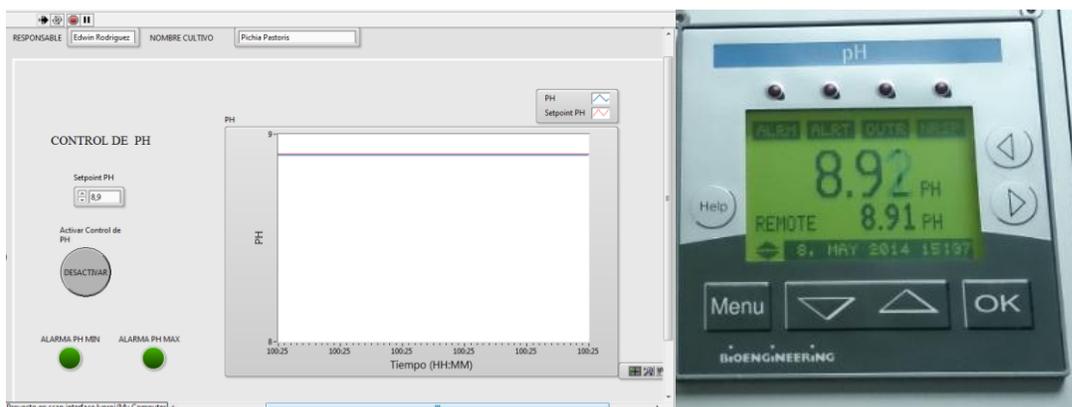


Figura 32. Comparación Display Bioengineering con Panel frontal del módulo de PH de LabVIEW con setpoint de 8,9.

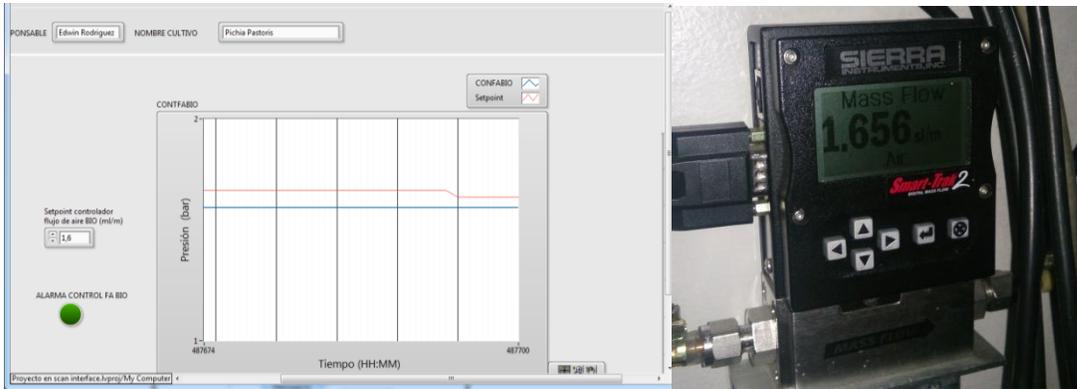


Figura 33. Comparación Display Sierra con Panel frontal del módulo de controlador de flujo de aire sintético de LabVIEW con setpoint de 1,6 sl/min.

El controlador de Metanol no pudo ser verificado debido a que se encontraba dañado el controlador de flujo de aire sintético Sierra.

### Alarmas

Se incrementaron los valores de la temperatura, agitación y del pH de forma manual desde el display del Bioengineering para comprobar la efectividad y velocidad de respuesta del código desarrollado. Algunas imágenes a continuación:

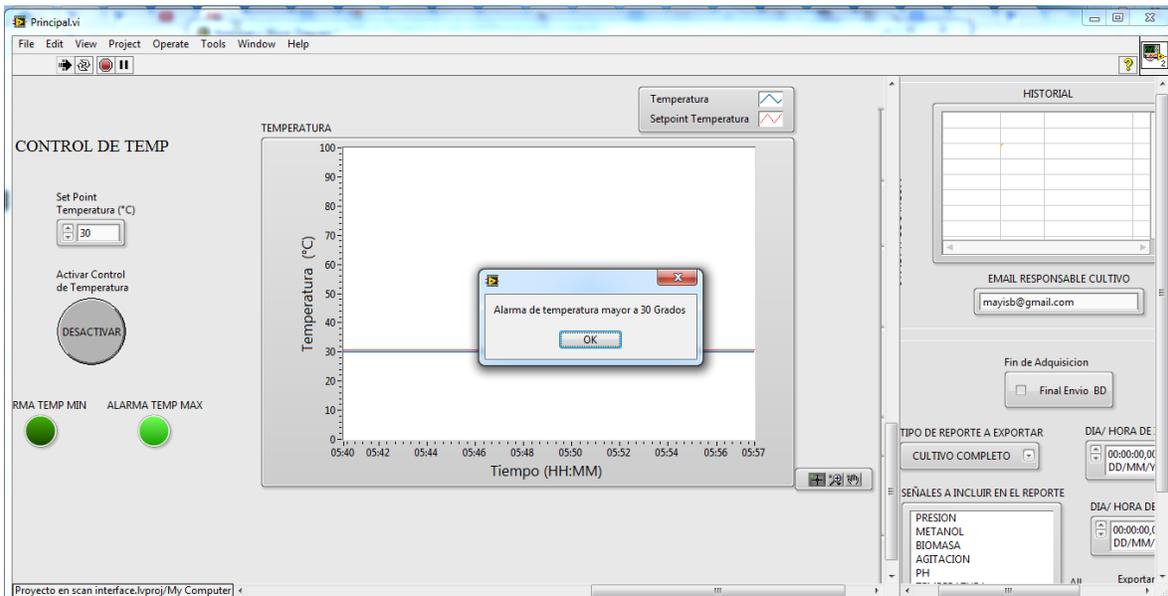


Figura 34. Alarma de temperatura máxima sobrepasada

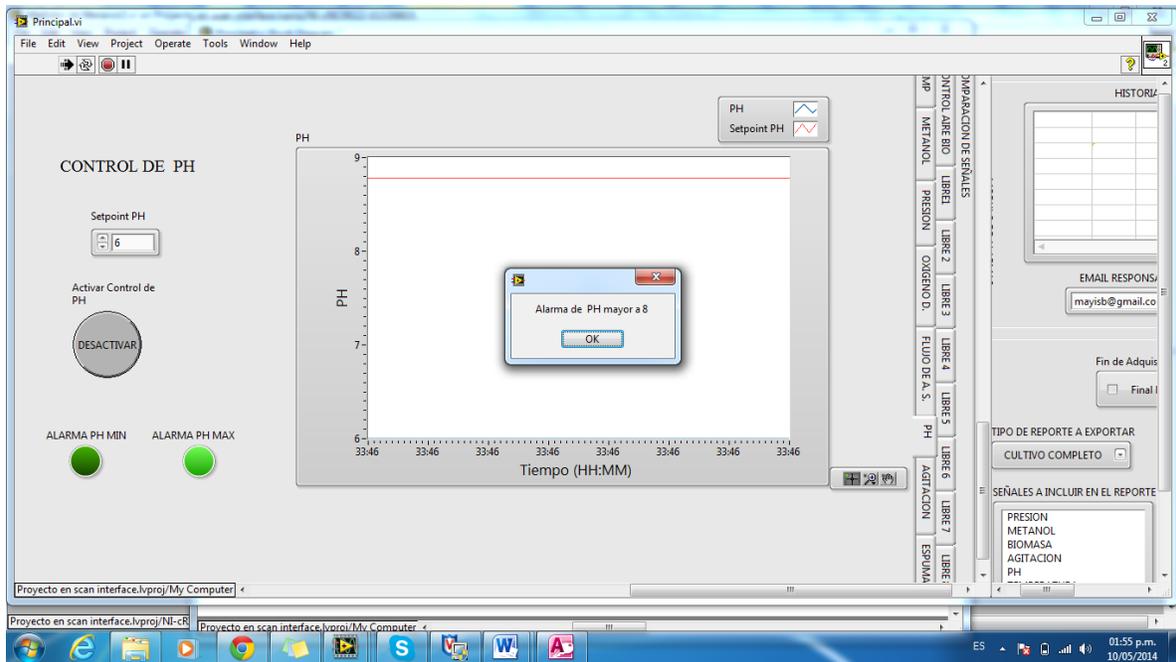


Figura 35. Alarma de PH máximo sobrepasado.

## Manejo de información en la Base de Datos

Se realizaron pruebas de almacenamiento y consulta de información en la base de datos sin inconvenientes. En el CD de documentación del proyecto se encuentra el archivo de pruebas, dentro del cual se modificaban las señales de referencia y las controladas, comprobando que todas quedaban almacenadas en la base de datos.

FECHA	SETPOINTTEMP	TEMP	SETPOINTPH	PH	SETPOINTAC	AGITACION	SETPOINTFA	FAS	SETPOINTCONTROLABIO	CONTR
05/02/2014 05:49:49 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:44 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:39 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:35 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:30 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:25 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:20 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:15 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:11 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:06 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:49:01 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:56 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:51 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:47 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:42 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:37 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:32 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:27 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:23 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:18 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:13 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:08 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:48:03 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:47:59 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0
05/02/2014 05:47:54 p.m.	30	31	8	8	600	605	0	0	0	0

Figura 36 .Archivos de pruebas procedente de la base de datos.

## **Capítulo 4**

### **Conclusiones**

- La solución diseñada e implementada permite al usuario capturar por medio del CRIO las señales y registrarlas en la base de datos para su posterior consulta mediante reportes.
- Se comprueba el adecuado manejo de alarmas porque se le notifica a la persona encargada tanto de manera visual como auditiva dentro del laboratorio y mediante envío de correo electrónico, sobre los eventos críticos del sistema.
- Con el almacenamiento de información en bases de datos se otorgó mayor robustez a la administración de datos y se incrementó la fiabilidad del proyecto.

### **Posibles Mejoras**

- Se propone explorar el uso de máquinas estados dentro del código del controlador determinístico y así permitir la integración de los nuevos controladores de Oxígeno. Esto optimizará el desempeño del equipo y permitir con mayor eficiencia al controlador determinar las prioridades de ejecución.
- Se sugiere mejorar el filtrado de señales enviadas al software de generación de reportes para darle más facilidad a los usuarios del el manejo y análisis de resultados

## **Bibliografía y fuentes de información**

- [1] **B. Moreno Esteban, M. A. Gargallo Fernández, De la Torre Casares Manuel**, Diagnóstico y Tratamiento en Enfermedades Metabólicas, Ediciones Díaz de Santos, 1997
- [2] **Nova Valenzuela Andrés**, Medición y Control de Concentración de Metanol en un Biorreactor para la producción de la enzima IDShr, 2011.
- [3] **Alvarado Mora Jorge, García Castillo German**, Sistema Scada para un Biorreactor, Trabajo de Grado 2011.
- [4] **National Instruments**, NI LabVIEW for CompactRIO Developer's Guide, 2012.
- [5] **Bioengineering AG**, *Manual de operación Biorreactor*, 2005
- [6] **National Instruments**, Database Connectivity Toolkit Manual, June 2008.
- [7] **Juan Antonio del Puente**, <http://laurel.datsi.fi.upm.es/~ssoo/STR/Introduccion.pdf>