


**Microbiología Predictiva**

**Desarrollo & Aplicabilidad de Modelos  
de Inactivación y Crecimiento  
Microbianos**

Maria G. Corradini, Ph.D.  
Profesor Asociado e Investigador  
Universidad Argentina de la Empresa



Introducción

**Microbiología Predictiva - Definición**

- ▶ *“Ciencia cuantitativa que permite evaluar objetivamente el efecto del procesamiento, distribución y almacenamiento en la calidad e inocuidad microbiológica de los alimentos”*  
McMeekin et al., 1993
- ▶ *“Necesidad de describir las respuestas microbianas al ambiente mediante el uso de modelos matemáticos”*  
McKellar y Xu, 2003

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

**Microbiología Predictiva -Definición**

- ▶ *“Ciencia que se basa en la premisa que el crecimiento, supervivencia e inactivación microbianas pueden ser cuantificadas y expresadas con ecuaciones matemáticas y que bajo un específico grupo de condiciones ambientales el comportamiento microbiano puede ser predicho”*  
Fratamico et al., 2005

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Microbiología Predictiva

- ▶ **MODELOS O ECUACIONES MATEMATICAS**
  - ▶ **CUANTIFICAR**
  - ▶ **DESCRIBIR**
  - ▶ **PREDECIR**

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Microbiología Predictiva

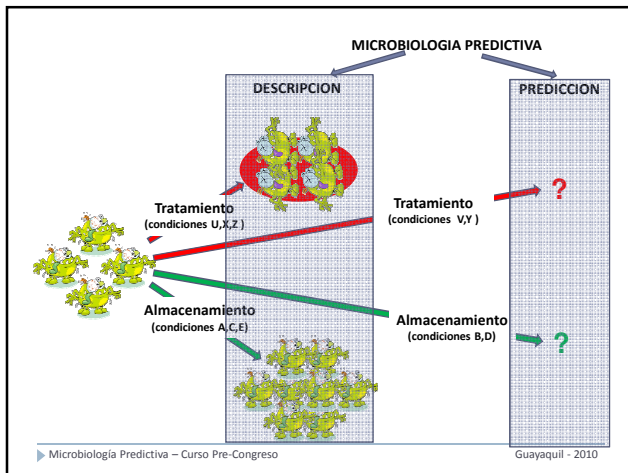
- ▶ *“Convertir un patrón de respuesta en un modelo matemático”* McMeekin et al. 2004
- ▶ **¿Para que usamos Microbiología Predictiva? ¿Para que modelar datos microbiológicos?**
  - ▶ **Obtener mayor información a partir de datos experimentales**
    - ▶ **Establecer relaciones entre procesos fisiológicos y crecimiento e inactivación**
  - ▶ **Comparar procesos o tratamientos**
  - ▶ **Analizar el efecto de un gran numero de escenarios a bajo costo**
  - ▶ **Evaluar riesgos**

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Microbiología Predictiva

- ▶ ¿Cuan adecuados son los modelos?
- ▶ ¿Cuales son las mayores limitaciones?
  - ▶ **Datos obtenidos**
  - ▶ **Complejidad del sistema, tratamiento**
- ▶ Si no permiten obtener descripciones o predicciones perfectas ¿por qué seguimos modelando?

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010



## Modelación y predicción

### OBTENCION DE DATOS MICROBIANOS

- ▶ Diseño experimental
  - ▶ Microbiología vs. Matemática
- ▶ Factores/VARIABLES relevantes
- ▶ Condiciones Relevantes
  - ▶ Numero que permita una buena modelización
    - ▶ Mínimo vs. óptimo
  - ▶ Interacciones

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### ¿Cuales factores deben ser incluidos en el modelo??

En matrices complejas como alimentos un gran número de factores pueden afectar el comportamiento microbiano

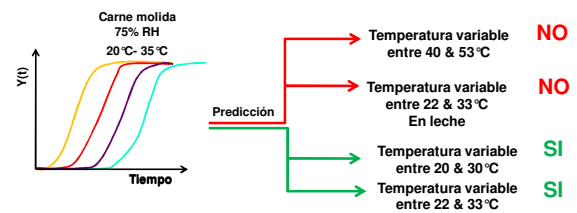
- ▶ Solo un par de ellos tienen un efecto relevante
  - ▶ Temperatura, pH &  $a_w$ /HR
- ▶ Solo los relevantes deben ser incluidos
  - ▶ La inclusión de más factores crea una complicación innecesaria
  - ▶ Bibliografía para pre-selección de factores
- ▶ Selección inadecuada de los factores a ser incluidos ⇒ **predicciones inadecuadas, uso limitado del modelo**

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Limitaciones de los modelos

- ▶ El rango de operación del modelo queda definido por los datos utilizados para generar el modelo



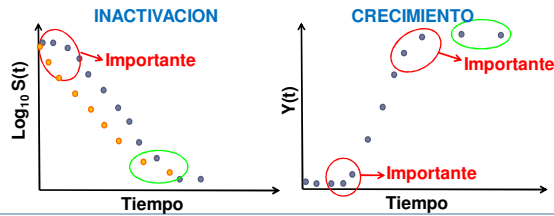
- ▶ Datos y modelos obtenidos utilizando un medio no pueden utilizarse para predecir lo que ocurriría en otro

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Limitaciones de los modelos

- ▶ Tomar en cuenta la historia previa del alimento
  - ▶ Pueden afectar la respuesta del microorganismo a los factores
- ▶ Mayor muestreo en el periodo de tiempo de mayor cambio
  - ▶ Corroboración de la fase estacionaria y del final de la fase lag



Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### INACTIVACION MICROBIANA

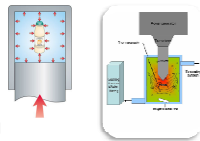
### Inactivación de microorganismos en alimentos

- ▶ Reducción significativa de la población microbiana para lograr un producto seguro y la prolongación de su vida útil

#### ▶ Procesos Térmicos

#### ▶ Tecnologías Emergentes

- ▶ Altas Presiones
- ▶ Radiación UV
- ▶ Ultra Sonido
- ▶ PFE-Campos eléctricos de alta intensidad



#### ▶ CINETICA DE INACTIVACION



Fuente : Bermudez et al., 2009

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Modelización Inactivación - Paso a Paso

**1. Determinación de la inactivación microbiana**  
 Condiciones Constantes (temperatura, HR, etc.)  
 • Selección de modelo adecuado (**MODELO PRIMARIO**) – Bondad de Ajuste  
 • **TRADICIONAL = LOG LINEAL**

**2.a. Dependencia de los parámetros del modelo con la temperatura , HR, etc.**  
 • Selección de modelo adecuado (**MODELO SECUNDARIO**) – Bondad de Ajuste  
 • Mala caracterización = mala predicción  
 • **TRADICIONAL = MODELO DE ARRHENIUS**

**2.b. Determinación y caracterización del perfil del tratamiento de interés**  
 • Tratamiento : Temperatura, presión, concentración de compuesto antimicrobiano, etc.  
 • No isotérmico  
 • Condiciones reales

**3. Solución de la ecuación diferencial correspondiente**  
 • Integra el perfil de temperatura y la dependencia con el tiempo y la temp.  
 • Obtención de la curva de inactivación condiciones reales

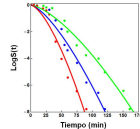
Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### INACTIVACION MICROBIANA

▶ Modelos primarios

**Describen la reducción de la población microbiana a lo largo del tiempo.**

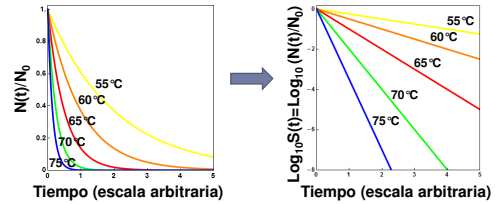
- ▶ Modelos Log-Lineales (de primer orden)
  - ▶ Problemas con los modelos actuales



- ▶ Modelos alternativos para inactivación microbiana
  - ▶ Modelo de Weibull
  - ▶ Modelo Bifásico
  - ▶ Descripción de “colas pronunciadas”
  - ▶ Curvas de supervivencia sigmoidales

### Modelo Log-Lineal

- ▶ Desarrollado en 1922
- ▶ Asume que la inactivación de células vegetativas y esporas presenta un comportamiento lineal cuando se las grafica en coordenadas semi-logarítmicas



- ▶ No contempla la aparición de “hombros” o “colas”

### Modelo Log- Lineal

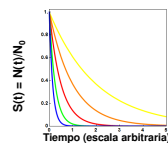
$$\frac{dN}{dt} = -k'N$$

$$\ln N = \ln N_0 - k't$$

Donde S = la proporción sobreviviente, dada por la relación entre N(t) número momentario de microorganismos al tiempo t y N<sub>0</sub> el inóculo inicial y k' es la constante de la velocidad de inactivación

Por lo tanto el numero de células que sobreviven decrece exponencialmente

$$S(t) = e^{-k't}$$



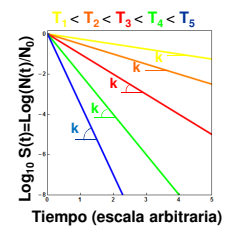
### Modelo Log- Lineal

- ▶ Cuando se realiza la transformación logarítmica (base 10)

$$\log_{10} S(t) = \log_{10} \left( \frac{N(t)}{N_0} \right) = -kt$$

Donde k = k' / ln10

- ▶ Ventajas de este modelo
  - ▶ Relación lineal
  - ▶ Extracción de parámetros sencilla
    - ▶ k= pendiente de la recta

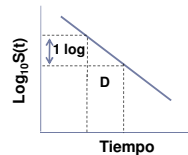


### Modelo Log-Lineal

- ▶ Si **(Y SOLO SI)** los datos obedecen una cinética log lineal se puede calcular D

- ▶ D = tiempo de reducción decimal

$$\log_{10} S(t) = \log_{10} \frac{N(t)}{N_0} = -\frac{t}{D}$$



- ▶ D es la recíproca de la pendiente de log S(t) vs. tiempo

$$\frac{1}{k} = D$$

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} N(t)}$$

- ▶ Medida de la resistencia térmica de un microorganismo
- ▶ Tradicionalmente utilizado para comparación

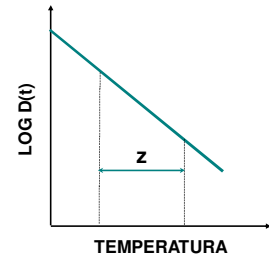
▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo Log-Lineal

- ▶ Al calcular el valor de D para cada Temperatura a la cual se siguió la inactivación, se lo puede graficar en función de la temperatura y obtener el valor z

- ▶ Z: el incremento de temp. necesario para reducir D un ciclo logarítmico



▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

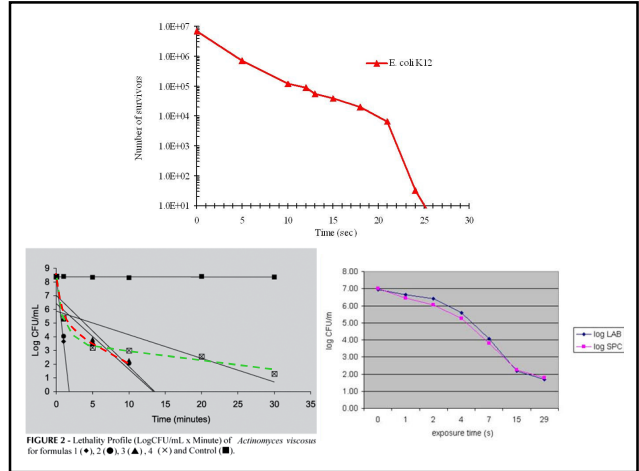
DEMASIADO FACIL PARA SER CIERTO

### ¿Que implica una cinética de primer orden?

1. Que un proceso isotérmico puede ser caracterizado usando una constante única (k) y la condición inicial ( $y_0$ ).
2. Que la constante exponencial (k) no depende del tiempo.
3. Que el/los reactivo/s no varían con el tiempo.

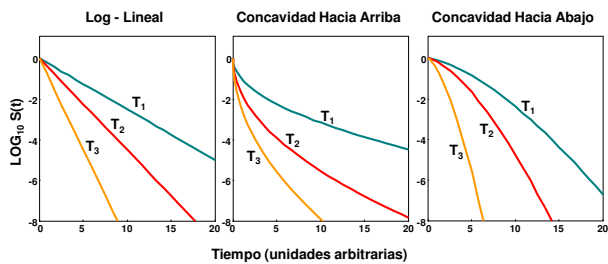
¿Son estas suposiciones realistas?

- Probablemente si, pero solo para algunos sistemas en particular.
- Probablemente existen condiciones apropiadas en sistemas simples pero no siempre.



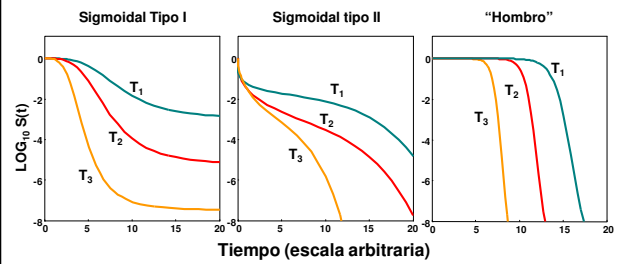
Ejemplos de Curvas de Inactivación

$$T_1 < T_2 < T_3$$



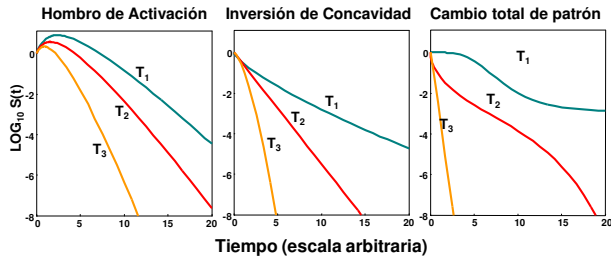
Ejemplos de Curvas de Inactivación

$$T_1 < T_2 < T_3$$



### Ejemplos de Curvas de Inactivación

$$T_1 < T_2 < T_3$$



Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Inactivación Microbiana No - Log Lineal

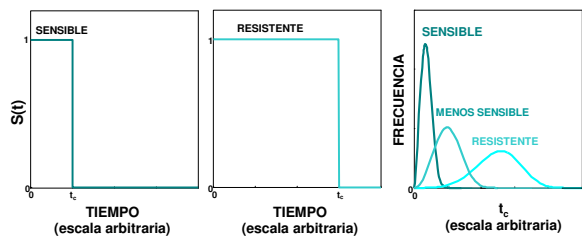
- ▶ Prevalencia
  - ▶ 2002 – Prof. van Boekel realizó un relevamiento de datos de inactivación publicados
  - ▶ 96 % de los casos exhibieron no linealidad
- ▶ Sin embargo se siguió (y sigue) usando el modelo log lineal para caracterizar inactivación microbiana
- ▶ Razones para conservar el modelo de 1922?
  - ▶ Inercia al cambio
  - ▶ Buen desempeño en relación a la inactivación
    - Sobre-procesamiento
  - ▶ Causas de la aparición de comportamiento no-log - lineal

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Inactivación Microbiana No - Log Lineal

- ▶ Causas
  - ▶ Previamente : Contribución de Artefactos
  - ▶ Población  $\Rightarrow$  Heterogeneidad de Resistencias Térmicas

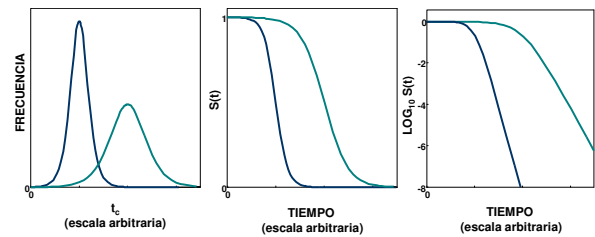


Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Inactivación Microbiana No - Log Lineal

- ▶ Una curva de inactivación puede considerarse como la distribución acumulativa de eventos de muerte

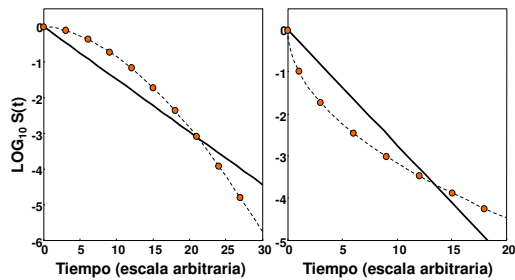


Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010



### ¿Que pasa cuando pasamos una línea por un grupo de datos con comportamiento no lineal?



▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Razones para usar modelos más precisos

- ▶ **Equivalencia de métodos no-isotérmicos**
- ▶ **Sobre-procesamiento**
  - ▶ Costo
  - ▶ Calidad
  - ▶ Formación de productos nocivos
- ▶ **Sub-procesamiento**
  - ▶ Seguridad
- ▶ **Adecuada selección de microorganismos indicadores**
- ▶ **Patógenos emergentes**

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelos alternativos para inactivación microbiana

- ▶ **Justificación para la utilización de modelos alternativos**
  - ▶ Mejor descripción durante la inactivación térmica por métodos convencionales
  - ▶ Adecuada caracterización de inactivación usando tecnologías emergentes
- ▶ **Modelos más populares**
  - ▶ Modelo de Weibull
  - ▶ Modelo Bifásico
  - ▶ Descripción de “colas pronunciadas”
  - ▶ Curvas de supervivencia sigmoidales
  - ▶ Caracterización de “Hombros” de Activación

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo de Weibull

$$\log_{10} S(t) = \log_{10} \frac{N(t)}{N_0} = -bt^n$$

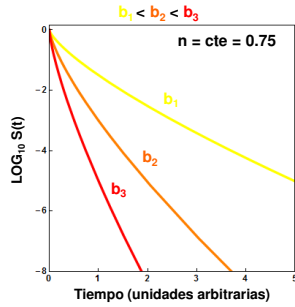
- ▶ Basado en la función de distribución de Weibull
  - ▶ Primeramente propuesto por Rosin-Rammler
- ▶ 2 parámetros en vez de uno
  - ▶ b= parámetro escalar
  - ▶ n= parámetro de “forma” (shape parameter)
- ▶ Aplicabilidad a curvas log-lineales y no log-lineales

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo de Weibull – Parámetro b

► b está relacionado a la velocidad de inactivación



Modelo de Weibull  
Wolfram  
Mathematica Player

► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo de Weibull – Parámetro n

► Si  $n = 1 \Rightarrow$  lineal

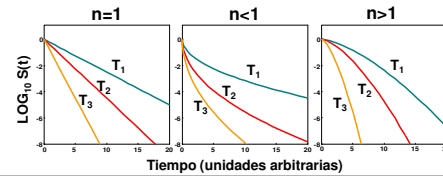
► La probabilidad de muerte es independiente del tiempo

► Si  $n < 1 \Rightarrow$  concavidad hacia abajo

► Las células que van quedando ofrecen mas resistencia

► Si  $n > 1 \Rightarrow$  concavidad hacia arriba

► Las células que van quedando se van volviendo más susceptibles al calor

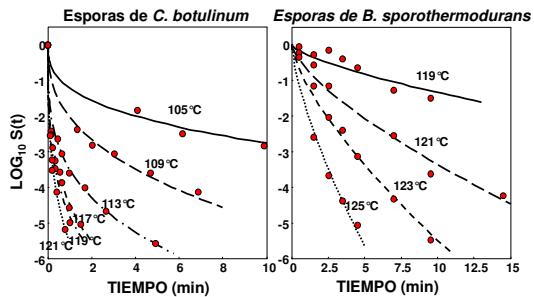


► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Inactivación Isotérmica: Esporas

► Ajuste con el Modelo de Weibull

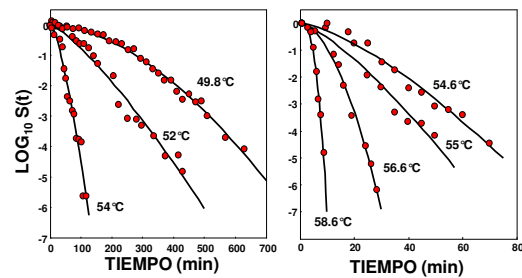


Datos Originales de Anderson et al. (1998) & Periago et al. (2004)

►

### Inactivación Isotérmica: E.coli

► Ajuste con el Modelo de Weibull



Datos Originales de Valdramidis et al. (2004)

► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

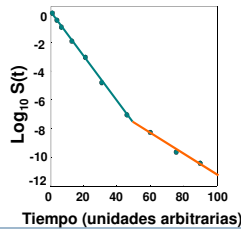
Guayaquil - 2010

### Modelo Bifásico

- ▶ Divide a la curva de inactivación en dos secciones

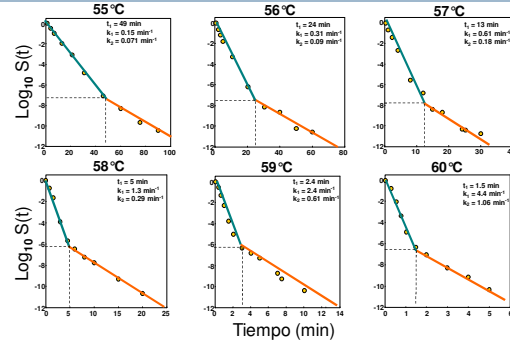
$$Si \quad t \leq t_1(T) \quad \log_{10} S(t) = -k_1(T)t$$

$$Si \quad t > t_1(T) \quad \log_{10} S(t) = -k_2(T)[t - t_1(T)]$$



▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Modelo Bifásico- *Salmonella typhimurium*



Datos Originales : Humpheson et al. (1998)

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Descripción de “colas pronunciadas”

- ▶ Bajo tecnologías emergentes la posibilidad de encontrar conteos residuales es factible
- ▶ Modelos antes mencionados implican que cuando

$$t \rightarrow \infty, \log_{10} S(t) \rightarrow -\infty$$



no pueden describir adecuadamente un residuo

- ▶ Modelo empírico

$$\log_{10} S(t) = -\frac{k_1 t}{k_2 + t}$$

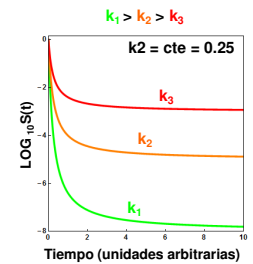
▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Descripción de “colas pronunciadas”

$$\log_{10} S(t) = -\frac{k_1 t}{k_2 + t}$$

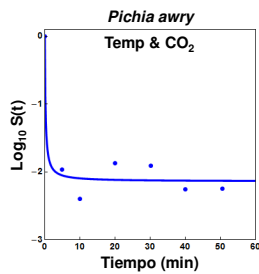
- ▶ 2 parámetros :  $k_1$  &  $k_2$
- ▶ El valor asintótico residual es  $-k_1(T)$

Modelo Empírico con Residuo  
Wolfram Mathematica Player



▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Descripción de "colas pronunciadas"



Datos Originales : Humpheson et al. (1998)

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

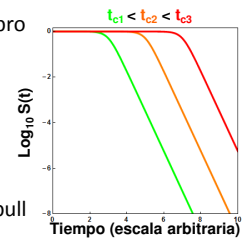
Guayaquil - 2010

### Curvas de Inactivación con Hombros

- ▶ Curvas de inactivación que comienzan con un hombro y cuya continuación es una línea recta

$$\log_{10} S = -\log_{10} \{1 + 10^{k[t-t_c]}\}$$

donde  $t_c$  marca la longitud del hombro y  $k$  es (aproximadamente) la pendiente de la parte lineal



Modelo Hombro  
Wolfram  
Mathematica Player

- ▶ Diferencia con el modelo de Weibull

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

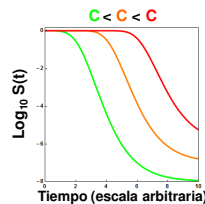
Guayaquil - 2010

### Curvas de Inactivación Sigmoidales

- ▶ Caracterización de curvas de inactivación sigmoidales que exhiben hombros y terminan con un residuo considerable
- ▶ Modelo Gompertz

$$\log_{10} S(t) = -A \cdot \exp\{-\exp\{-B \cdot [t - C]\}\}$$

▶ donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  son coeficientes que dependen de la condición prevalente (por ej. temperatura)

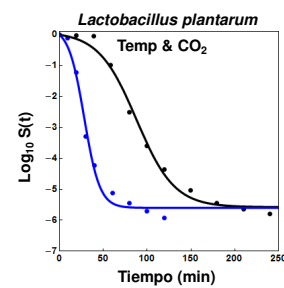


Modelo de Gompertz  
Wolfram  
Mathematica Player

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Curvas de Inactivación Sigmoidales



Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

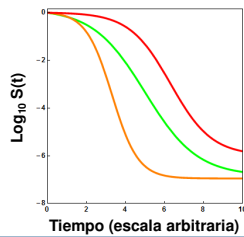
Guayaquil - 2010

### Curvas de Inactivación Sigmoidales

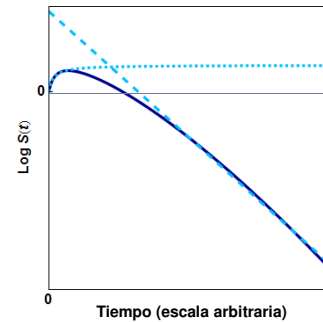
► **Modelo Logístico**

$$\log_{10} S(t) = \frac{a}{1 + \exp(k * t_c)} - \frac{a}{1 + \exp[k(t_c - t)]}$$

donde  $a$ ,  $k$  y  $t_c$  son coeficientes que dependen de la condición prevalente (por ej. temperatura)



### Caracterización de “Hombros” de Activación



### Caracterización de “Hombros” de Activación

► **Doble Weibull (Van Boekel, 2009)**

- 4 parámetros

$$\log S(t) = k_1 t^{m_1} - k_2 t^{m_2} \quad m_1 < m_2$$

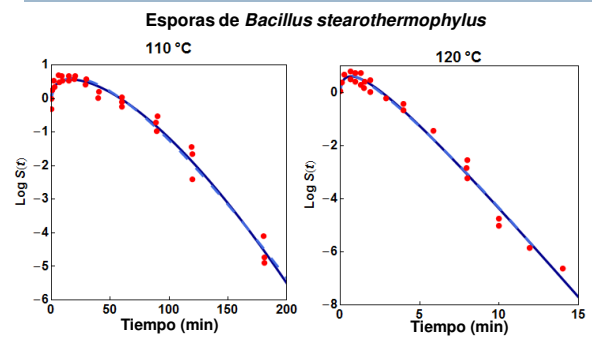
► **Corradini et al.'s model**

- 4 parámetros

$$\log S(t) = \frac{a t \exp\left[-\left(\frac{t}{t_c}\right)^m\right]}{b + t} \quad m \geq 1$$



### Caracterización de “Hombros” de Activación

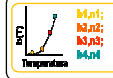


Datos Originales de Sapru et al. (1993)

### Modelos y Parámetros

Modelo	Numero de parámetros	Parámetros	Conversión a Modelo Dinámico
Log-Lineal	1	k	✓
Weibull	2	b, n	✓
Bifásico	3	t <sub>c</sub> , k <sub>1</sub> , k <sub>2</sub>	✓
"Colas"	2	k <sub>1</sub> , k <sub>2</sub>	✓
"Hombros"	2	k', t <sub>c</sub>	✓
Gompertz	3	A, B, C	✓
Logístico	3	a, k, t <sub>c</sub>	✓

### Inactivación Microbiana – Efecto de las Condiciones



#### 2.a. Dependencia de los parámetros del modelo con la temperatura, HR, etc.

- Selección de modelo adecuado (**MODELO SECUNDARIO**) – Bondad de Ajuste
- Mala caracterización = mala predicción
- **TRADICIONAL = MODELO DE ARRHENIUS**

#### Modelos Secundarios

- Describen respuestas de los parámetros del modelo primario a cambios en las condiciones ambientales
  - "Velocidad de la reacción de deterioro" (k)
  - Temperatura

#### Modelo Secundario Tradicional

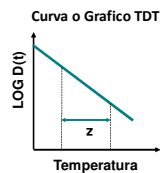
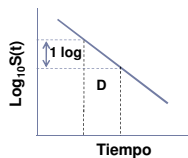
- Modelo de Arrhenius

#### Alternativas

- Modelo Log Logístico

### Dependencia de la Inactivación con la Temperatura

- ▶ Curvas TDT (Thermal Death Time)
  - ▶ Normalmente obtenidas con 3 o 4 valores de D solamente
    - ▶ Imprecisión en la estimación de parámetros
      - Predicciones inadecuadas
    - ▶ Dificultad para establecer la presencia de comportamientos no-lineales



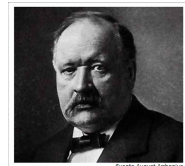
### Dependencia de los Parámetros/Coefficientes de los Modelos con la Temperatura

#### Modelo de Arrhenius

- ▶ Derivación empírica
- ▶ Relaciona k con la temperatura absoluta

$$k = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

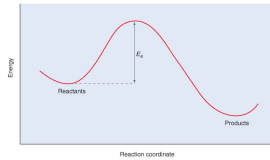


A: factor "pre-exponencial" o factor de frecuencia  
La dimensión de A debe ser la misma que la de k

### Dependencia de los Parámetros de los Modelos con la Temperatura

- ▶ Energía de activación
  - ▶ Barrera energética que las moléculas deben cruzar para reaccionar

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$



### Dependencia de los Parámetros de los Modelos con la Temperatura

- ▶ Re-parametrización
- ▶ Introducir una temperatura de referencia

$$c = c_0 \exp(-kt)$$

$$c = c_0 \exp \left[ -A \exp \left( -\frac{E_a}{RT} \right) \cdot t \right]$$

$$k_1 = A \exp \left( -\frac{E_a}{RT_1} \right)$$

$$k_2 = A \exp \left( -\frac{E_a}{RT_2} \right)$$

$$\frac{k}{k_{ref}} = \exp \left[ -\frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right]$$

### Modelo de Arrhenius

$$k = k_0 e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

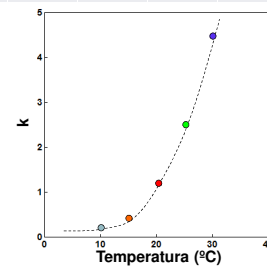
$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_A}{RT}$$



- ▶  $E_A$  = energía de activación
  - ▶ Unidades: cal/mol
  - ▶ Medida de la sensibilidad a la temperatura
- ▶  $R$  = Constate universal de los gases= 1.987 cal/mole °K
- ▶  $T$  = Temperatura absoluta (°K)

### Dependencia de k

	Temperatura (°C)				
	10	15	20	25	30
k	0.2	0.4	1.2	2.5	4.5



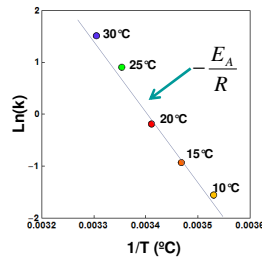
### Dependencia de k con la Temperatura

□ “Linearización”

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_A}{RT}$$

□ Conversión de la temperatura

□ Transformación de los valores de k



### Problemas

$$\frac{E_A}{R}$$

¿Cual es la relación entre la

**Constante Universal de los Gases y:**

- la degradación enzimática de pectinas o hidrólisis de almidón?
- el crecimiento microbiano?
- la viscosidad de un concentrado de jugo de naranjas?

$$\frac{E_A}{R}$$

⇒ ¿A que equivale un mol en  $E_A$  (kJ/mol) de:

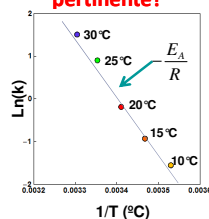
- Concentrado de Jugo de Naranjas?
- Esporas Bacterianas?

**Un mol de esporas equivale aproximadamente a 200,000 toneladas!!!!**

### Preguntas Adicionales

▶ ¿Por que log k?

▶ ¿Realmente “k” (cuando puede ser definida) cambia varios ordenes de magnitud en el rango de temperatura pertinente?



### Inactivación Microbiana = Procesos Complejos

▶ Que  $E_A$  sea independiente de la temperatura implica que:

▶ Exista una “reacción limitante” que controla el proceso (¿¿Prueba??)

O

▶ Todos los sub-procesos estén coordinados de tal manera que siempre haya una sola “energía de activación” (¿¿Evidencia??)



## Ecuación de Arrhenius – Conversión de Temperatura

$$\ln\left(\frac{k(T_1)}{k(T_2)}\right) = \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)$$

$$k(T) = k_0 e^{\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}$$

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

## Problemas

## Conversiones de Temperatura

5-40°C → 0.0036-0.0032 (crecimiento microbiano)

30-65°C → 0.0033-0.0030 (crecimiento e inactivación microbiana; actividad e inactivación de enzimas)

80-120°C → 0.0028-0.0025 (activación e inactivación de esporas)

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

## Problemas con el modelo clásico

## MISMA CINÉTICA A BAJAS Y ALTAS TEMPERATURAS

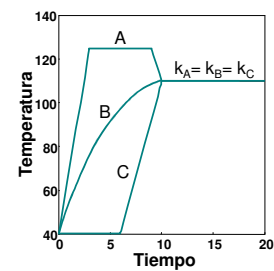
- ▶ ¿Es cierto en reacciones bioquímicas catalizadas por una enzima que puede ser inactivada?
- ▶ ¿Es cierto para esporas bacterianas que pueden “activarse” y luego ser inactivadas?

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

## Velocidad de reacción solo depende de la temperatura

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \quad \text{o} \quad k = k_0 e^{\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}$$



▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Procesos Complejos

► Que  $E_A$  sea independiente de la temperatura implica que:

- Exista una "reacción limitante" que controla el proceso  
(¿¿Prueba??)

o

- Todos los sub-procesos estén coordinados de tal manera que siempre haya una sola "energía de activación" (¿¿Evidencia??)

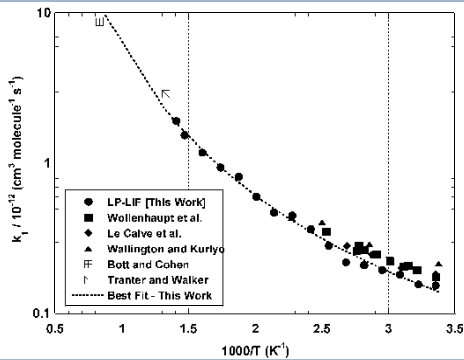
### Modelo Log Lineal

$$\log\left(\frac{D}{D_{ref}}\right) = \frac{T - T_{ref}}{z}$$

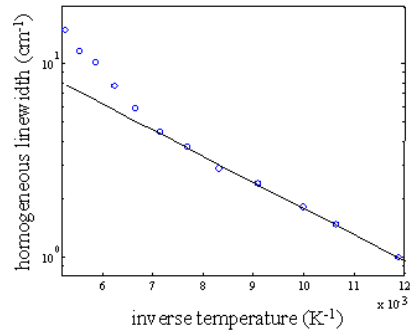
### Ecuación de Arrhenius

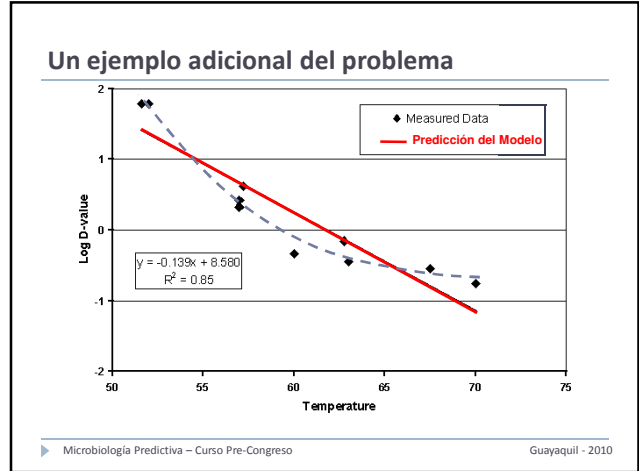
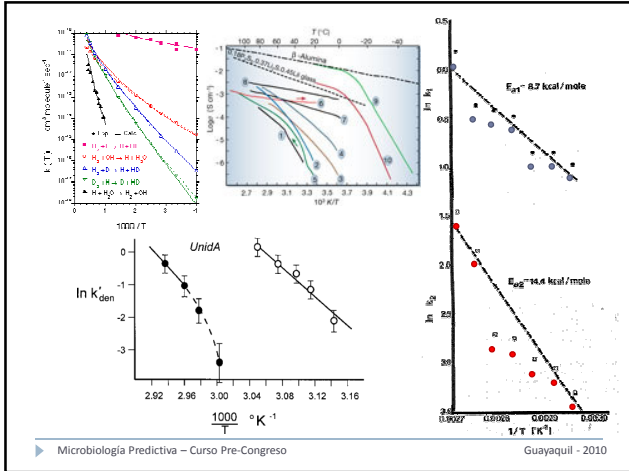
$$\ln\left(\frac{k}{k_0}\right) = \frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)$$

....qué pasa en este caso?



No todas las reacciones siguen el modelo de Arrhenius...





### Modelo de Arrhenius - Resumen

$$\log(k) = k_0 \exp\left[\frac{E_A}{RT}\right]$$

- **Ventaja:**
  - Linearización
- **Desventaja:**
  - No demasiado flexible
  - Conversión de Temperatura
  - Significado

PETROU et al. (2002)  
Chemistry Ed: Research & Practice in Europe, 3 :87-97

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso  
Guayaquil - 2010

### Modelos Alternativos - Dependencia de la Temperatura

► Modelo de la potencia (Behlgradek, 1935)

$$k = b(T - T_0)^c$$

**k = velocidad de reacción**  
**T<sub>0</sub> = Temperatura cuando k = 0**  
**b & c son constantes (diferentes para cada organismo)**

► Casos especiales

- Si c = 1, la dependencia de la temperatura es lineal
- Si c = 2, el modelo se lo llama raíz cuadrada.

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso  
Guayaquil - 2010

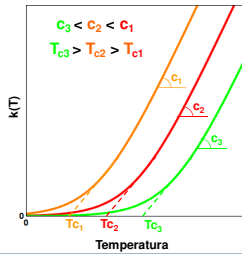
### Modelos Alternativos - Dependencia de la Temperatura

▶ Modelo Log Logístico

$$k(T) = \text{Log} \{ 1 + \exp [c(T - T_c)] \}$$

▶ Parámetros mas intuitivos

- ▶ C: velocidad de cambio
- ▶ T<sub>c</sub>: temperatura crítica a la cual el cambio se vuelve prevalente



### Selección de modelos

▶ **Los datos deben determinar la selección del modelo**

- ▶ Analizar los datos sin pre-concepciones
- ▶ **Los modelos pueden NO ser únicos**
- ▶ Varios modelos proveen un ajuste adecuado

▶ **¿Como los evaluamos?**

- ▶ Gráficamente
- ▶ Medidas de Bondad de Ajuste
  - ▶ R<sup>2</sup> o R<sup>2</sup> ajustado (limitado a modelos lineales)
  - ▶ RMSE
  - ▶ Residuos
  - ▶ Criterio de información de AKAIKE (AIC)

▶ **Validación**

- ▶ A partir de un grupo de datos que no se haya usado para generar el modelo

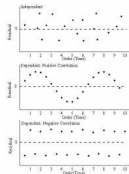
### Bondad de Ajuste

▶ R<sup>2</sup> 
$$R^2 = 1 - \frac{SS_{er}}{SS_{tot}} = 1 - \frac{SS_{er}}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

▶ R<sup>2</sup> ajustado 
$$R^2_{adj} = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-p-1} = 1 - \frac{SS_{er} \cdot df_e}{SS_{Tot} \cdot df_t}$$

▶ RMSE 
$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (r_{ajustados} - r_{observados})^2}{n}}$$

▶ Residuos 
$$r_i = y_i - \bar{y}_i$$



### Selección de modelos

▶ Bondad de ajuste

▶ Simplicidad

- ▶ > numero de parámetros en un modelos, el ajuste mejora
- ▶ > incertidumbre en la estimación de parámetros
- ▶ Propagación de errores

▶ Principio de Parsimonia

▶ Comparación de modelos

- ▶ = numero de parámetros, ≠ estructura
- ▶ Criterio de Akaike
  - ▶ Residuo de suma de cuadrados
  - ▶ Agrega una penalidad por el número de parámetros

**Inactivación bajo condiciones no estacionarias)**

Procesamiento no-isotérmico, no-isobárico, inactivación con concentraciones variables de agentes antimicrobianos

### Modelización Inactivación – Paso a Paso

1. Inactivación Isotérmica
- 2.a. Perfil No Isotérmico
- 2.b. Dependencia de la Temp.
3. Solución
 
$$\frac{d \log_{10} S(t)}{dt} = -b[T(t)]n[T(t)] \left[ \frac{\log_{10} S(t)}{b[T(t)]} \right]^{n[T(t)]-1}$$

**CURVA DE INACTIVACION BAJO CONDICIONES DINAMICAS**

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

**La velocidad instantánea de reacción corresponde a la velocidad isotérmica a la temperatura momentánea en ese tiempo en particular para ese estado del sistema**

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

**Construcción de la curva de inactivación observada bajo condiciones dinámicas**

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

**Inactivación Dinámica – Modelo de Weibull**

$$\log_{10} S(t) = -b(T) t^{n(T)}$$

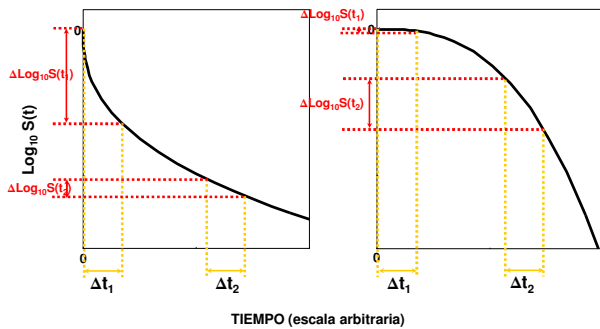
$$\left. \frac{d \log_{10} S(T)}{dt} \right|_{T=const} = -b(T)n(T)t^{n(T)-1}$$

$$t^* = \left( -\frac{\log_{10} S(t)}{b(T)} \right)^{\frac{1}{n(T)}}$$

**Inactivación Dinámica – Modelo de Weibull  
(Rate equation)**

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b[T(t)]n[T(t)] \left\{ -\frac{\log S(t)}{b[T(t)]} \right\}^{\frac{n[T(t)]-1}{n[T(t)]}}$$

**Ecuación Diferencial a Ecuación a Diferencia**



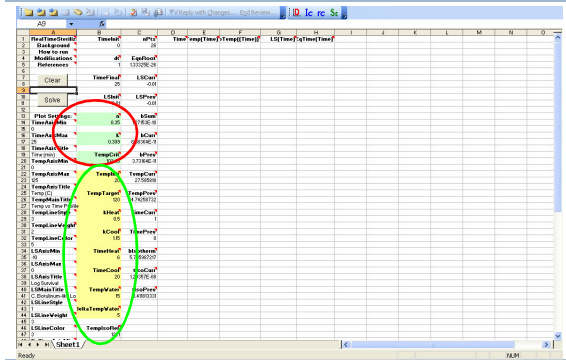
**Ecuación Diferencial a Ecuación a Diferencia**

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b[T(t)]n[T(t)] \left\{ -\frac{\log S(t)}{b[T(t)]} \right\}^{\frac{n[T(t)]-1}{n[T(t)]}}$$

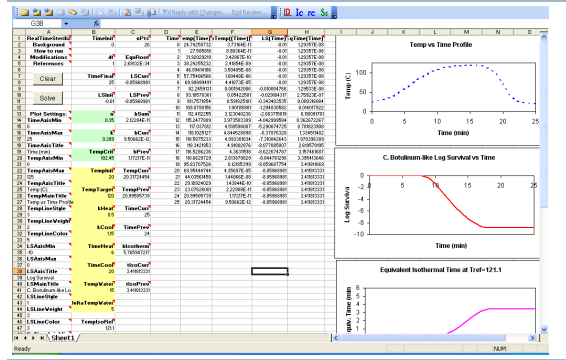


$$\frac{\log_{10} S(t_i) - \log_{10} S(t_{i-1})}{t_i - t_{i-1}} = -\frac{b[T(t_i)] + b[T(t_{i-1})]}{2} \times n \left\{ \frac{-[\log_{10} S(t_i) + \log_{10} S(t_{i-1})]}{b[T(t_i)] + b[T(t_{i-1})]} \right\}^{\frac{n-1}{n}}$$

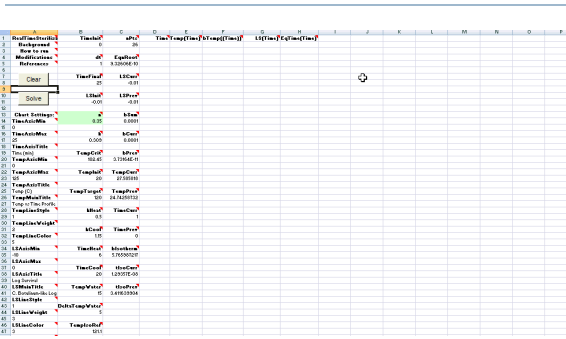
### UMass Inactivación – Programas de Excel



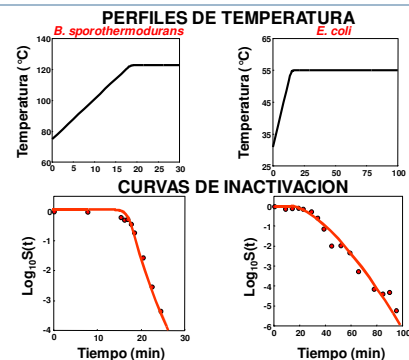
### UMass Inactivación – Programas de Excel



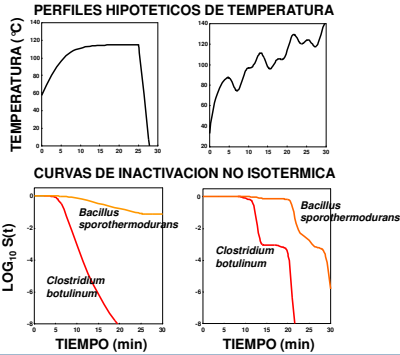
### UMass Inactivación – Programas de Excel



### Inactivación No-Isotérmica



### Inactivación No-Isotérmica- Simulaciones



Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Modelos Combinados

- ▶ Posibilidad de predecir el efecto de dos factores simultáneamente
  - ▶ Aw & Temperatura
  - ▶ Temperatura & Presión
  - ▶ Temperatura & Agentes Antimicrobianos
  - ▶ .....
- ▶ Importancia para procesos con tecnologías emergentes

### Para un proceso combinado de $a_w$ -Temperatura

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b(t)n(t) \left\{ \frac{-\log S(t)}{b(t)} \right\}^{\frac{n(t)-1}{n(t)}}$$

- ▶ donde  $b(t)$  y  $n(t)$  están determinados por la historia de  $a_w$  - *Temperature*
- ▶ Su determinación requiere conocer siguientes relaciones  $b(a_w(T(t)))$ ,  $n(T(a_w(t)))$  o  $n(a_w(T(t)))$
- ▶ La dificultad no radica en la resolución de la ecuación diferencia sino en establecer las relaciones de los parámetros con la *Temperatura* y la  $a_w$

### Inactivación Dinámica – Modelo Bifásico

$$\begin{aligned} \text{If } t \leq t_1(T) \quad \log_{10} S(t) &= -k_1(T)t \\ \text{If } t > t_1(T) \quad \log_{10} S(t) &= -k_1(T)t_1(T) - k_2(T)[t - t_1(T)] \end{aligned}$$

$$\frac{d \log_{10} S(t)}{dt} = \text{If} [\log_{10} S(t) \geq -k_1[T(t)]t_1[T(t)], -k_1[T(t)], -k_2[T(t)]]$$

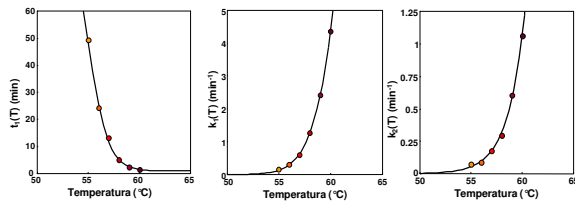
```
NDSolve[{Y'[T] == If[Y >= -k1[T(t)]*t1[T(t)], -k1[T(t)], -k2[T(t)]], Y[0] == 0, Y[t], {t, 0, tCycle}]
```

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010



### Modelo Bifásico- *Salmonella typhimurium*

► Dependencia de los parámetros con la Temperatura

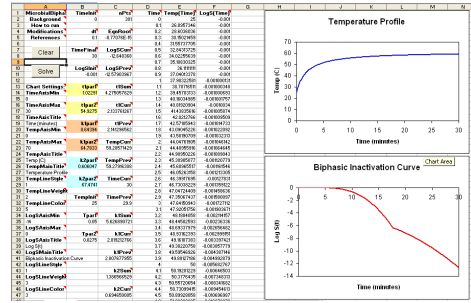


► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo Bifásico: UMass Programa de Excel

<http://www-unix.oit.umass.edu/~aew2000/Biphasic/Biphasic.html>

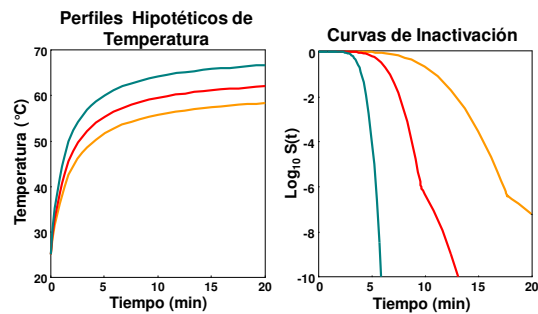


► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo Bifásico- *Salmonella typhimurium*

Simulaciones bajo calentamiento no isotérmico

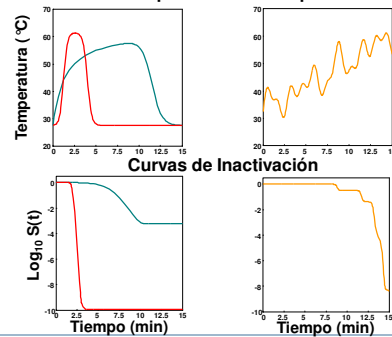


► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo Bifásico- *Salmonella typhimurium*

Perfiles Hipotéticos de Temperatura

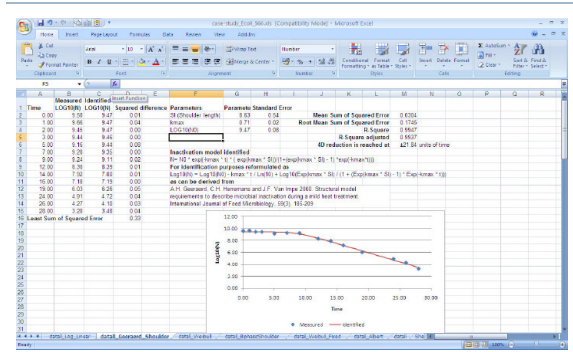


► Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

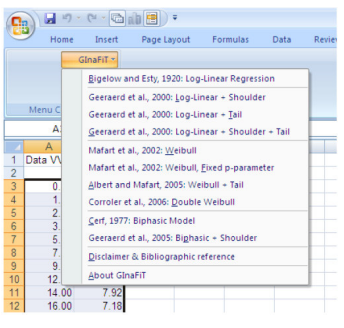
Guayaquil - 2010

Utilización de programas informáticos para la caracterización y predicción de inactivación microbiana

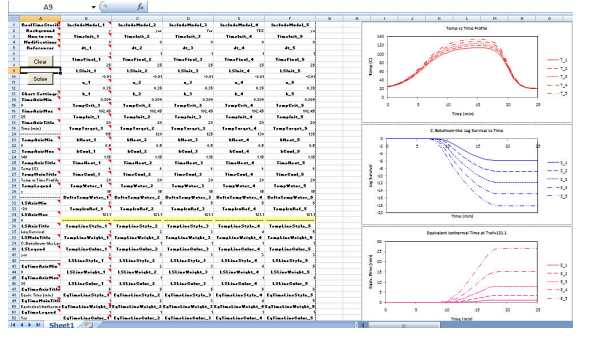
### GlnaFit



### GlnaFit



### UMass Inactivación – 5 Curvas Simultáneas



## Wolfram Demonstrations Project

A Wolfram Web Resource

TOPICS ▾ LATEST ▾ RANDOM ▾ ABOUT ▾ FAQ ▾ SEARCH

2555 Demonstrations

Free Download  
**Mathematica Player**  
for all Operating Systems

Become a Contributor - Author Login

An open resource of interactive Mathematica visualizations...

from elementary education to front-line research

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

## UMass - Demostración en Mathematica

**temperature profile parameters**

initial temperature control: 0.20

TTarget: target temperature: 0.50

hmax: maximum heating rate: 0.8

KCool: maximum cooling rate: 0.85

hmax: mid heating time: 0.4

KCool: mid cooling time: 0.20

TWater: cooling water temperature: 0.0

dWater: minimum product-water temperature difference: 1.0

**Weibullian rate parameters**

To: lethal temperature marker: 100.45

k: lethality rate factor: 0.309

n: Weibullian concavity parameter: 0.25

**Temperatura (°C)**

**Log10 St**

**Tiempo Equivalente (min)**

**Tiempo (min)**

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

## UMass - Perfil de Temperatura

**temperature profile parameters**

initial temperature control: 0.20

target temperature: 57.76

maximum heating rate: 0.8

maximum cooling rate: 0.85

mid heating time: 0.4

mid cooling time: 0.20

cooling water temperature: 0.0

minimum product-water temperature difference: 1.0

temperature profile

temperature (°C)

time (min)

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

## UMass - Curva de Inactivación

**temperature profile parameters**

initial temperature control: 0.20

target temperature: 54.53

maximum heating rate: 0.8

maximum cooling rate: 0.85

mid heating time: 0.4

mid cooling time: 0.20

cooling water temperature: 0.0

minimum product-water temperature difference: 1.0

**Weibullian rate parameters**

lethal temperature marker: 102.45

lethality rate factor: 0.309

Weibullian concavity parameter: 0.25

log survival ratio

log survival ratio

time (min)

Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso Guayaquil - 2010

### Letalidad de un proceso

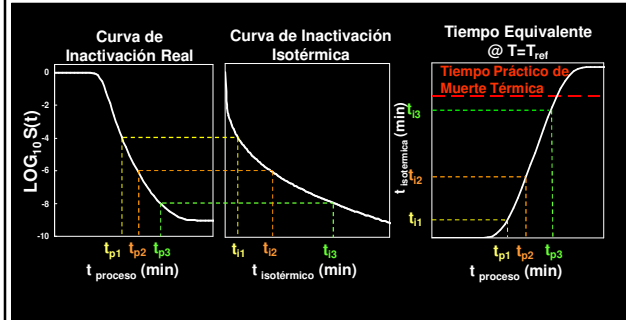
- ▶ Valor  $F_0$
- ▶ Tiempo equivalente a una temperatura de referencia  $T_{ref}$  que provee la misma inactivación que el proceso observado

$$F_0 = \int_0^t 10^{\frac{T(t)-T_{ref}}{z}} dt$$

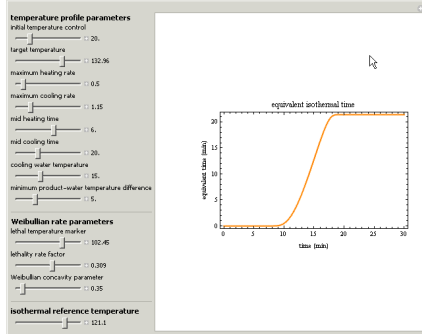
- ▶ La relación entre  $F_0$  y la reducción decimal esta dada por :

$$\log S(t) = -\frac{F_0}{D_{ref}} = -\frac{1}{D_{ref}} \int_0^t 10^{\frac{T(t)-T_{ref}}{z}} dt$$

### Cálculo de Tiempo Equivalente



### UMass - Tiempo Equivalente



Modelos probabilísticos de inactivación microbiana

### Modelos Determinísticos vs. Modelos Probabilísticos

- ▶ **Modelos Determinísticos**
  - ▶ Como resultado proveen valores numéricos "exactos"
  - ▶ La misma entrada siempre provee el mismo resultado
- ▶ **Modelos Probabilísticos**
  - ▶ También referido a estocástico
  - ▶ Proveen un resultado que contempla la variabilidad de un sistema y de sus componentes
  - ▶ La misma entrada provee diferentes resultados

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelos Probabilísticos

Los procesos a nivel molecular y celular determinan el destino de un microorganismo o espora y por lo tanto determinan el destino de una población

En la mayoría de los casos desconocemos como debido a dos razones principales:

- a. Variabilidad entre las células o esporas debido a diferencias genéticas
- b. Las condiciones locales dentro del alimento y las historias individuales de cada célula.

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

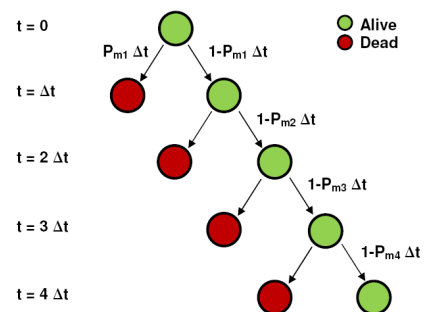
### Modelos Probabilísticos

- ▶ **Objetivos:**
- ▶ Modelar el destino de una pequeña cantidad de células
- ▶ Desarrollar un modelo que permita evaluar condiciones estáticas y dinámicas

▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Inactivación de Células Vegetativas



▶ Microbiología Predictiva – Curso Pre-Congreso

Guayaquil - 2010

### Modelo Probabilístico de Inactivación: Discreto y Continuo

▶ En el modelo discreto, si solo se observa muerte, la probabilidad de supervivencia de una célula individual puede expresarse como:

$$P(n) = \prod_{i=1}^n [1 - P_m(t)\Delta t]$$

▶ Mientras que el modelo continuo

$$N(t) = N_0 \cdot \exp\left(-\int_0^t P_m(s)ds\right)$$

▶ Donde  $N(t)$  es el no. de células viables después de un tiempo  $t$ ,  $N_0$  el inoculo inicial,  $s$  una variable de integración,  $P_m(s)$  es equivalente a  $P_m(t)$  en el modelo discreto.

### Metodología

▶ Si se asume una Probabilidad de Muerte ( $P_m$ )

$$P_m(t) = 0.30$$

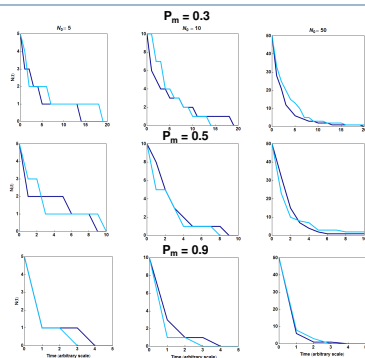
▶ A cada célula para cada estadio se le asigna un numero aleatorio  $R_n$  con una distribución uniforme ( $0. \leq R_n \leq 1.$ ).

▶ Si  $R_n \leq 0.30$ , la célula **muere**.

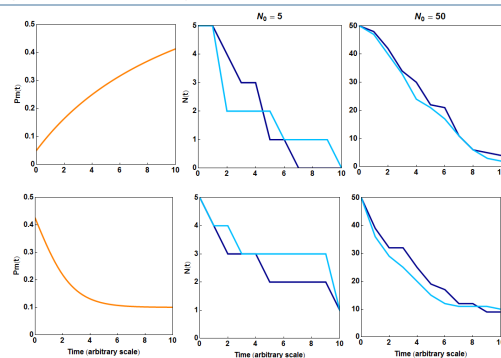
▶ Si  $R_n > 0.30$ , la célula **sobrevive** y pasa al siguiente estadio....

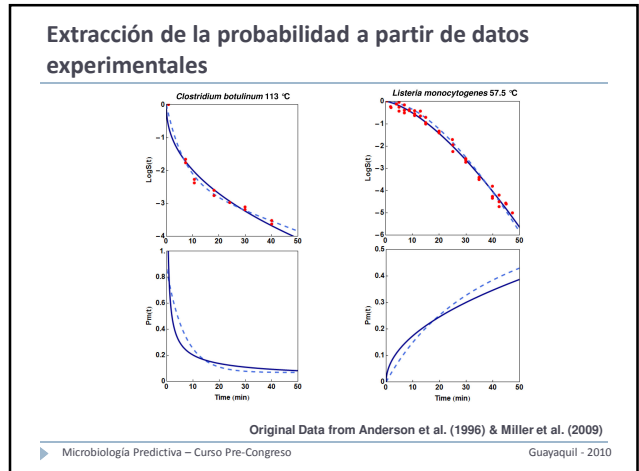
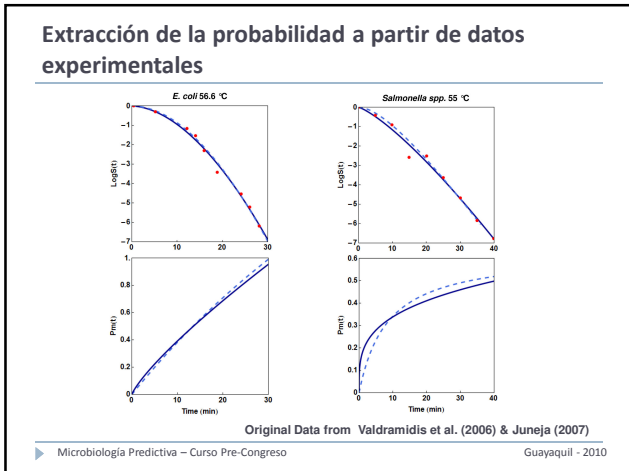
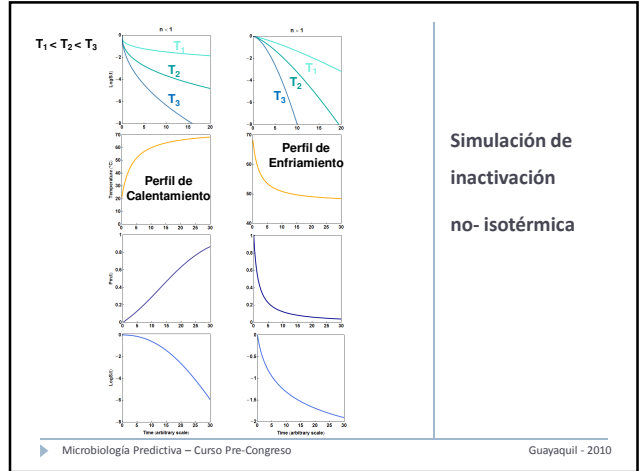
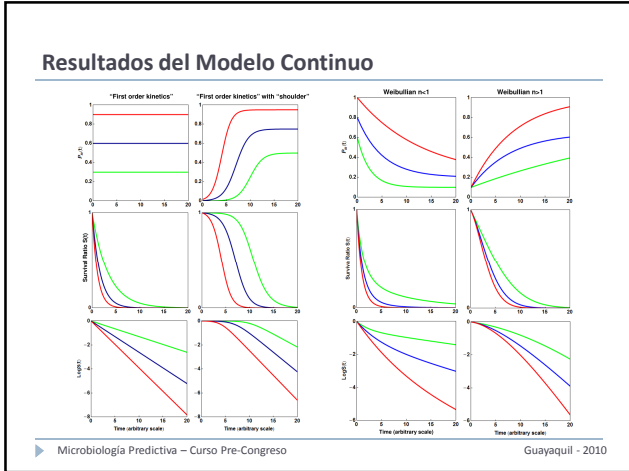
▶ En cada estadio se suman el número de células remanentes para contabilizar la población

### Resultados para el Modelo Discreto para un número pequeño de células

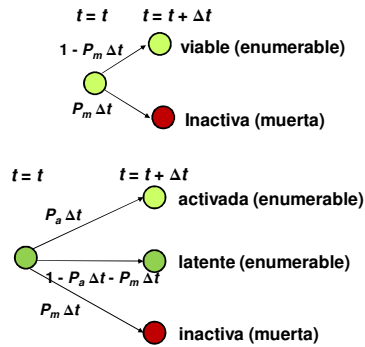


### Resultados para el Modelo Discreto para un número pequeño de células bajo condiciones no isotérmicas

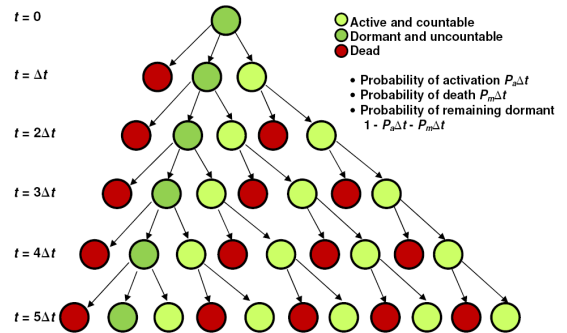




### Inactivación de esporas viables y latentes



### Activación y Supervivencia de una Espora Latente



### Modelo discreto

$$\begin{aligned}
 P(0) &= 0 \\
 P(1) &= P_a(1) \\
 P(2) &= [1 - P_a(1) - P_m(1)]P_a(2) + P_a(1)[1 - P_m(2)] \\
 P(3) &= \\
 &[1 - P_a(2) - P_m(2)]P_a(3) \\
 &+ [1 - P_a(1) - P_m(1)]P_a(2)[1 - P_m(3)] \\
 &+ P_a(1)[1 - P_m(2)][1 - P_m(3)]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P(4) &= \\
 &[1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)]P_a(4) \\
 &+ [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)]P_a(3)[1 - P_m(4)] \\
 &+ [1 - P_a(1) - P_m(1)]P_a(2)[1 - P_m(3)][1 - P_m(4)] \\
 &+ P_a(1)[1 - P_m(2)][1 - P_m(3)][1 - P_m(4)] \\
 P(5) &= \\
 &[1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)][1 - P_a(4) - P_m(4)]P_a(5) \\
 &+ [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)]P_a(4)[1 - P_m(5)] \\
 &+ [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)]P_a(3)[1 - P_m(4)][1 - P_m(5)] \\
 &+ [1 - P_a(1) - P_m(1)]P_a(2)[1 - P_m(3)][1 - P_m(4)][1 - P_m(5)] \\
 &+ P_a(1)[1 - P_m(2)][1 - P_m(3)][1 - P_m(4)][1 - P_m(5)]
 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 P(n) = & \\
 & [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)][1 - P_a(4) - P_m(4)][1 - P_a(5) - P_m(5)] \dots P_a(n) \\
 & + [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)][1 - P_a(4) - P_m(4)] \dots P_a(n-1)[1 - P_m(n)] \\
 & + [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)] \dots P_a(n-2)[1 - P_m(n-1)][1 - P_m(n)] \\
 & \cdot \\
 & + [1 - P_a(1) - P_m(1)]P_a(2)[1 - P_a(3)][1 - P_m(4)] \dots [1 - P_m(n-2)][1 - P_m(n-1)][1 - P_m(n)] \\
 & + P_a(1)[1 - P_m(2)][1 - P_m(3)][1 - P_m(4)] \dots [1 - P_m(n-3)][1 - P_m(n-2)][1 - P_m(n-1)][1 - P_m(n)]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 P(n) = & \\
 & [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)][1 - P_a(4) - P_m(4)][1 - P_a(5) - P_m(5)] \dots P_a(n) \\
 & + [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)][1 - P_a(4) - P_m(4)] \dots P_a(n-1)[1 - P_m(n)] \\
 & + [1 - P_a(1) - P_m(1)][1 - P_a(2) - P_m(2)][1 - P_a(3) - P_m(3)] \dots P_a(n-2)[1 - P_m(n-1)][1 - P_m(n)] \\
 & \cdot \\
 & + [1 - P_a(1) - P_m(1)]P_a(2)[1 - P_m(3)][1 - P_m(4)] \dots [1 - P_m(n-2)][1 - P_m(n-1)][1 - P_m(n)] \\
 & + P_a(1)[1 - P_m(2)][1 - P_m(3)][1 - P_m(4)] \dots [1 - P_m(n-3)][1 - P_m(n-2)][1 - P_m(n-1)][1 - P_m(n)]
 \end{aligned}$$

