



Modelos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos

C. P. Coronel – Aguilera^{*}, M.T. Jiménez – Munguía y A. López-Malo – Vigil

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

Tradicionalmente, la eficacia de los procesos de preservación ha sido evaluada con base en la suposición de que la muerte microbiana sigue la cinética de primer orden. Este criterio, el cual ha sido de gran utilidad en microbiología, no siempre es aplicable a la inactivación/inhibición microbiana ya que no todas estas curvas de inactivación microbiana siguen una cinética de primer orden. Es por esto que una variedad de modelos alternativos han sido desarrollados para describir curvas de supervivencia semi-logarítmicas. Varios autores han reportado que la distribución de Fermi y la de Weibull describen satisfactoriamente curvas de supervivencia no lineales de esporas y células microbianas. Estos modelos son adecuados para curvas que presentan concavidades hacia abajo y/o concavidades hacia arriba, sin el empleo de los tradicionales valores D y z , que requieren la aproximación lineal. Estos modelos predictivos de inactivación permiten cuantificar la respuesta microbiana en tratamientos con agentes letales convencionales o no convencionales y combinados. Este artículo presenta una revisión acerca de los modelos de cinética de primer orden, de distribución de Fermi y Weibull, así como algunas ventajas y desventajas de su aplicación.

Palabras clave: *Sobrevivencia microbiana, modelos de inactivación, cinética de primer orden, distribución de Fermi, distribución de Weibull.*

Abstract

Traditionally, the efficacy of preservation processes has been evaluated with the basis of the assumption that microbial mortality follows a first-order kinetics. This hypothesis, which has been of great utility in microbiology, not always is applicable to the microbial inactivation/inhibition because not all of these microbial inactivation curves follow first order kinetics. This is why a variety of alternative models has been developed to describe semilogarithmic survival curves. Several authors have reported that Fermi's distribution and Weibull's distribution describe satisfactorily non linear survival curves of microbial cells and bacterial spores. These models are suitable for downward concavity curves, as well as for upward concavity curves, without the use of the traditional D and z values, which require linear approximation. These predictive inactivation models allow to quantify the microbial response in treatments with conventional/not conventional lethal agents or in combination. This article presents a review of the models of first order kinetics, Fermi's distribution and Weibull's distribution, and it's advantages and disadvantages of their application as well.

Keywords: *Microbial survival kinetics, inactivation models, first order kinetics, Fermi's distribution, Weibull's distribution.*

^{*} Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: claudiap.coronela@udlap.mx

Introducción

En la industria de alimentos, la introducción de cualquier tecnología alternativa o la combinación de varias tecnologías tradicionales y no tradicionales, así como la optimización de métodos tradicionales para el procesamiento de alimentos, requieren de datos científicos acerca de la respuesta microbiana. En particular, modelos y parámetros cinéticos son esenciales para desarrollar procesos de preservación de alimentos que garanticen la inocuidad. Estos parámetros también permiten comparar la habilidad de distintos procesos tecnológicos para reducir poblaciones microbianas. No hay duda de que la microbiología cuantitativa es uno de los enfoques más útiles, no sólo en la determinación del impacto microbiológico de diferentes pasos asociados con la producción, la distribución y la venta de un alimento, sino también en la determinación de condiciones óptimas para muchos procesos de conservación. La microbiología predictiva proporciona herramientas para comparar el impacto de diferentes factores y dosis aplicada sobre la reducción de una población microbiana, siendo una ayuda para entender el comportamiento de sistemas biológicos (Alzamora *et al.*, 2008).

Actualmente existen diversos modelos matemáticos utilizados para evaluar los procesos de conservación en alimentos, al aplicar diferentes factores, dentro de los cuales el más utilizado por los investigadores es la cinética de primer orden. Esta cinética se basa en que las curvas de supervivencia de células y esporas microbianas están regidas por una relación lineal entre el logaritmo decimal del número de microorganismos sobrevivientes y el tiempo de tratamiento a una temperatura dada. Sin embargo, existen curvas de supervivencia microbiana que no siguen esta tendencia lineal. Debido a las desviaciones de la linealidad (concavidades) que pueden presentar las cinéticas de

inactivación se puede ocasionar un sobreprocesamiento o subprocesamiento, ya que los parámetros de dichos procesos convencionalmente se aplican a partir de la cinética de primer orden y haciendo referencia a un microorganismo en particular. La dificultad para explicar cada desviación de la linealidad de dichas cinéticas ha ocasionado que varios autores desarrollen otros modelos cinéticos que sean compatibles con las formas reales de las curvas de supervivencia (Whiting, 1995; Körmendy y Körmendy, 1997; Peleg y Pechina, 2000; Alzamora *et al.*, 2008).

Un punto de vista alternativo consiste en que la curva de supervivencia no debería ser tratada en el término cinético absoluto, sino como una forma acumulativa de una distribución temporal de eventos letales. Estos representan las diferentes resistencias de la población expuesta o tratada al espectro del agente letal. Según este punto de vista, las diferentes formas de las curvas de supervivencia son una manifestación de las propiedades de la distribución como pueden ser su mediana, moda, desviación estándar, sesgo, entre otros. Los cambios de forma que ocurren al ir cambiando las condiciones externas (la temperatura, la concentración de agentes antimicrobianos, el pH), son interpretados como cambios que se reflejan en los parámetros de la distribución (Peleg y Pechina, 2000; Couvert *et al.*, 2005).

Algunos modelos matemáticos relativamente simples que permiten la cuantificación de los efectos de varios agentes letales para la inactivación microbiana y su uso para el procesamiento de alimentos son por ejemplo el modelo de Fermi y de Weibull. Sin embargo, existe la necesidad de mayor investigación para avanzar en el entendimiento de la cinética de inactivación microbiana y los modelos para curvas de supervivencia no lineales (Heldman y Newsome, 2003).

En esta revisión se presentan algunos modelos matemáticos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos, como son: la cinética de primer orden, la distribución de Fermi y la de Weibull.

Revisión bibliográfica

Curvas de respuesta a la dosis

Una curva de respuesta a la dosis consiste en una gráfica que describe la relación entre el número o la fracción de microorganismos sobrevivientes y la dosis de un agente letal a la cual han sido expuestos. La dosis es expresada en unidades del factor a evaluar como tiempo, partes por millón, rads, intensidad de un campo eléctrico, etc. (Peleg, 2006). Las curvas de respuesta a la dosis tienen típicamente una forma sigmoidea, caracterizada por una región marginal de inhibición o letalidad casi imperceptible, seguida de una región claramente lineal, representando un decaimiento exponencial. Este comportamiento tradicionalmente ha sido separado en dos regiones, una con efecto marginal (o ningún efecto), a bajas intensidades de exposición del factor de preservación y una segunda región con un comportamiento lineal (después de una transformación logarítmica), que es modelado por la cinética de primer orden. Un enfoque alternativo para modelar la respuesta a la dosis microbiana es el de considerarla continua para el rango entero del factor de preservación aplicado, sin cambios abruptos de la cinética de respuesta, pero con transición gradual a partir del efecto marginal (o no efecto) a intensidades relativamente bajas hasta efectos inhibitorios o letales en altas intensidades del factor de preservación. La población microbiana decae como resultado de la exposición a agentes letales (por ejemplo, alta temperatura, dosis de

irradiación, tratamientos con altas presiones), y pueden ser descritas por la función de Fermi (López-Malo *et al.*, 2002), la distribución de Weibull, la cinética de primer orden, entre otros modelos.

La adquisición de datos para aclarar las interacciones de múltiples variables asociadas con sistemas de alimentos ha estado en proceso durante varias décadas, particularmente para determinar cómo la actividad antimicrobiana es afectada por otros parámetros (López-Malo *et al.*, 2002). El tratamiento matemático de la curva de respuesta a la dosis es muy similar a las de las curvas de supervivencia, pero el tiempo de exposición es sustituido por la dosis administrada. A altas dosis de un agente letal se puede causar la mortalidad casi instantánea de la población microbiana expuesta, por el contrario con dosis bajas podría tenerse un efecto retrasado. La diferencia desde el punto de vista de modelado, radica en que, en el primer caso (dosis altas), el tiempo no es el factor primario, pero en el segundo (dosis bajas) si lo es (Peleg, 2006).

a. Cinética de primer orden

En inactivación térmica o no térmica de microorganismos, por lo general cuatro tipos comunes de curvas de supervivencia semi-logarítmicas pueden encontrarse (Figura 1): curvas lineales (inactivación de primer orden), curvas con hombro o período inicial lag, curvas con una cola (o curvas bifásicas) y curvas sigmoideas (Alzamora *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, la inactivación microbiana ha sido considerada un proceso que sigue la cinética de primer orden (Figura 1c), suponiendo que las células o esporas tienen idéntica resistencia a un agente letal y cada microorganismo tiene la misma

probabilidad de morir (Alzamora *et al.*, 2008). Siguiendo este enfoque mecanístico, la ecuación propuesta por Chick (1908) ha sido usada extensamente para calcular la esterilidad en métodos térmicos de preservación:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -kN(t) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, $N(t)$ es el número de células al tiempo t , y k es la constante de velocidad de inactivación (Alzamora *et al.*, 2008).

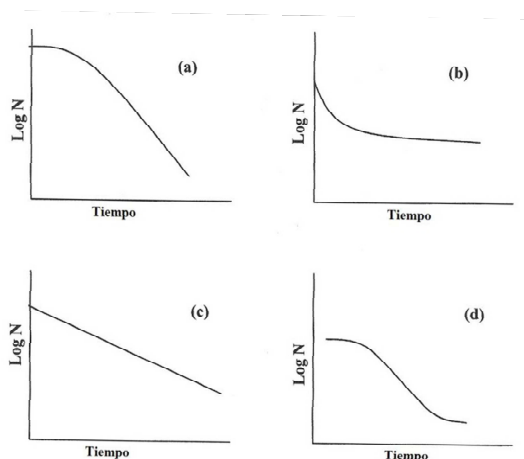


Fig. 1. Diferentes curvas de inhibición/inactivación: a) con hombro, b) con cola, c) logarítmica lineal, d) sigmoidea (Adaptada de Alzamora *et al.*, 2008).

El concepto conocido como el tiempo de reducción decimal, o valor D , se derivó de esta ecuación, después de su integración y transformación logarítmica:

$$\log \left(\frac{N_0}{N(t)} \right) = \frac{t}{D} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde, N_0 es el número inicial de células, $N(t)$ es el número de células al tiempo t , donde $D=2.303/k$. Esta ecuación puede expresarse en la forma más familiar:

$$\log N(t) = \log N_0 - t/D \quad (\text{Ec. 3})$$

La dependencia de la temperatura en el valor D , es expresada usando el valor de z , es decir, el aumento de la temperatura que reduciría el tiempo de reducción decimal por un factor de 10 (Alzamora *et al.*, 2008).

b. Modelo de distribución de Fermi

Este modelo supone que la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo individual, i , es una función escalón $S_i(X)$, donde X es la intensidad del agente letal en las unidades pertinentes y X_{ci} es el nivel en el cual un microorganismo es destruido (Peleg, 2006):

Si $X \leq X_{ci}$, entonces

$$S_i(X) = 1 \text{ o } \log S_i(X) = 0$$

Y si $X > X_{ci}$, entonces

$$S_i(X) = 0 \text{ o } \log S_i(X) \rightarrow -\infty$$

(Ec. 4)

Según esta definición, X_{ci} es una medida de la resistencia o la sensibilidad del microorganismo al agente letal. A mayor X_{ci} , más tolerante es el microorganismo; a menor X_{ci} , más susceptible es el microorganismo. La curva de respuesta a la dosis de una población microbiana $S(X)$, compuesta de individuos con resistencias diferentes de X_{ci} , se expresa como:

$$S(X) = \sum S_i(X) \Delta\phi_i \quad (\text{Ec. 5})$$

donde $\Delta\phi_i$ es la fracción de microorganismos, o esporas, que sucumben a la misma dosis letal, $\sum(\Delta\phi_i) = 1$ (Peleg, 2006).

Cuando la población microbiana es suficientemente grande y su espectro de resistencia es suficientemente denso, la ecuación 5 puede ser aproximada por una expresión basada en una distribución paramétrica, que describe el espectro de resistencia o sensibilidad del microorganismo, definido en términos de los niveles de dosis de los agentes que causan su mortalidad (Fig. 2). La distribución de Fermi se puede expresar entonces como:

$$S(X) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{X - X_c}{k}\right)} \quad (\text{Ec.6})$$

donde k es una constante representando la extensión de la distribución y X_c es la moda y mediana para distribuciones normales sin sesgo. En la ecuación 6, cuando k es grande en relación con $X - X_c$, la distribución es angosta; por lo contrario cuando k es pequeña, la distribución es amplia. De tal forma, la distribución de Fermi es siempre simétrica (Peleg, 2006).

La función de distribución de Fermi es continua, por lo tanto, ésta puede ser ajustada por medio de procedimientos de regresión estándar no lineales aún para las curvas de respuesta a la dosis con mucha pendiente. Sin embargo, debido a que la magnitud de k tiene poca importancia, especialmente cuando datos experimentales en y cerca de X_c no están disponibles, sería prudente fijar el valor de k por adelantado, dejando a X_c como único parámetro ajustable para ser determinado por la regresión (Peleg, 2006). El uso particular de la función de Fermi es que sus constantes (X_c y k) pueden ser directamente relacionados con la forma de la curva de supervivencia, lo que hace posible la comparación entre microorganismos o la evaluación de la intensidad del factor que determina la

supervivencia microbiana (Alzamora *et al.*, 2008).

Las curvas de respuesta a la dosis también pueden ser descritas por la distribución de Weibull que a continuación se describe.

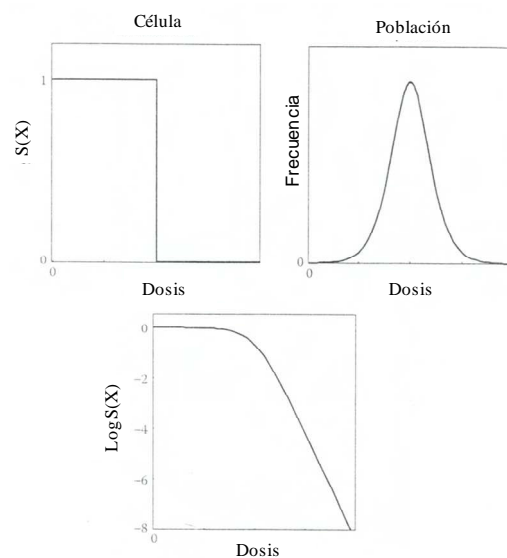


Fig. 2. Vista esquemática de la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo descrito por la función de Fermi (arriba izquierda), la distribución de las dosis letales a las cuales individuos de una población sucumben (arriba derecha), y la correspondiente curva de respuesta a la dosis (abajo) (Adaptada de Peleg, 2006).

c. Modelo de distribución de Weibull

La función de distribución de Weibull toma en consideración la variación biológica de una población de microorganismos y es usada para describir el espectro de las resistencias de dicha población a un agente letal en diferentes condiciones (Mafart *et al.*, 2002; Alzamora *et al.*, 2008). Las principales ventajas del modelo basado en la distribución de Weibull son su simplicidad y su capacidad de modelar las curvas de supervivencia que son lineales y aquellas que contienen hombro o regiones con cola (Peleg *et al.*, 1997; Peleg y Cole,

1998; Peleg, 1999; Peleg y Pechina, 2000; Mafart *et al.*, 2002). Con los parámetros apropiados, la función de distribución de Weibull puede explicar distribuciones claramente sesgadas y distribuciones casi absolutamente simétricas (Mafart *et al.*, 2002; Couvert *et al.*, 2005; Peleg, 2006).

Una curva de respuesta a la dosis de una población microbiana, que refleja un espectro de resistencias o sensibilidades que tiene una distribución de Weibull tendría la forma:

$$S(X) = (N/N_o) = \exp(-bX^n) \quad (\text{Ec.7})$$

donde, $S(X)$ es la fracción de microorganismos sobrevivientes; N_o es el número inicial de células y N el número de células al tiempo t ; b y n son constantes, los cuales pueden ser obtenidos empleando una técnica de regresión no lineal; $\beta = 1/b$ como el factor de posición de la distribución y n como el factor de forma. (Guerrero *et al.*, 2004; Peleg, 2006).

Peleg y Cole (1998) escribieron este modelo en la siguiente forma de logaritmo decimal:

$$\log \frac{N}{N_o} = -bX^n \quad (\text{Ec. 8})$$

La moda de la distribución, X_m , es

$$X_m = \left(\frac{n-1}{nb} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Ec. 9})$$

Su mediana es:

$$\bar{X} = \frac{\Gamma\left(\frac{n+1}{n}\right)}{b^{\frac{1}{n}}} \quad (\text{Ec. 10})$$

Y su varianza es:

$$\sigma_x^2 = \frac{\Gamma\left(\frac{n+2}{n}\right) - \left[\Gamma\left(\frac{n+1}{n}\right)\right]^2}{b^{\frac{2}{n}}} \quad (\text{Ec. 11})$$

donde Γ es la función gamma (Peleg, 2006).

El coeficiente de sesgo (oblicuidad), v_1 , está dado por:

$$v_1 = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}} \quad (\text{Ec. 12})$$

donde $\mu_3 = \Gamma(1 + 2/n)/b^{3/2}$ y $\mu_2 = \Gamma(1 + 2/n)/b^{2/n}$ (Peleg, 2006).

La moda, X_m , representa el tiempo de tratamiento al cual la mayoría de la población muere o se inactiva. La mediana, \bar{X} , corresponde al tiempo de inactivación promedio. El coeficiente de sesgo, v_1 , representa el sesgo de la distribución (Alzamora *et al.*, 2008).

Cuando curvas de respuesta a la dosis son ajustadas con la ecuación 7 como modelo, se espera que la n adquiera valores del orden de 1.5 a 5. Por ejemplo, si $n > 1$, indica la existencia de un pico de frecuencia (moda) en algún sitio en medio del rango de la dosis aplicada; por consiguiente, el valor de b correspondiente podría tener un valor numérico muy pequeño. Por ejemplo, si la distribución no es demasiado sesgada y tiene una dosis promedio del orden de 25 unidades arbitrarias y un factor de forma $n=3$, la b estará sobre el orden de 10^{-5} en las unidades correspondientes. Tales valores, especialmente cuando se combina con una n de número no entero, el modelo es muy poco atractivo para ser presentado

en su forma original. Sin embargo, la conversión de sus parámetros b y n en promedio, moda, varianza o la desviación estándar, y un coeficiente de sesgo (Ec. 9-12) facilitaría enormemente la comparación entre diferentes organismos. Esto también puede ser usado para cuantificar la influencia de condiciones de crecimiento u otros factores sobre el mismo organismo (Peleg, 2006).

De acuerdo con el modelo (Ec. 8), la gráfica $\log S(X)$ vs t presenta concavidad hacia abajo siempre que $n > 1$ y una concavidad hacia arriba siempre que $n < 1$; mientras que cuando $n = 1$ la curva de supervivencia es lineal y la distribución de Weibull se reduce a una distribución exponencial. Un coeficiente de sesgo $v_1 > 1$ indica que la curva es sesgada a la derecha, mientras que $v_1 < 1$ indica que está sesgada a la izquierda; y una distribución con un valor de $v_1 = 1$ indica que ésta es simétrica (Alzamora *et al.*, 2008).

Diferentes formas de este modelo han sido reportadas en la literatura (Mafart *et al.*, 2002, van Boekel, 2002); sin embargo la forma logarítmica decimal (ecuación 13), la cual es similar a la ecuación 3, parece ser más apropiada para describir curvas de supervivencia semi-logarítmicas:

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (\text{Ec. 13})$$

donde δ es el primer tiempo de reducción que conlleva a la reducción de la décima parte de la población sobreviviente y p es el parámetro de forma (n del modelo de Weibull). Para el caso tradicional, cuando la curva de supervivencia es de primer orden, la n es igual a uno y el parámetro δ corresponde al valor clásico D . Este

sencillo modelo puede ser considerado como una extensión de la ecuación de primer orden convencional. Como el valor de D , la influencia de la temperatura de calentamiento sobre el valor δ conduce a una relación logarítmica lineal. De la misma manera que con la cinética de primer orden, el valor clásico de z puede ser evaluado (Mafart *et al.*, 2002; Couvert *et al.*, 2005).

Aplicación de los modelos

La aplicación del modelo de cinética de primer orden en curvas de respuesta a la dosis ha dominado el campo de la microbiología cuantitativa por muchos años. El concepto del valor D ha sido utilizado en procesos de conservación térmicos así como no térmicos. El objetivo de investigar la dependencia de la temperatura en inactivación térmica es para poder calcular el tratamiento necesario en combinaciones tiempo-temperatura en la pasteurización o esterilización de alimentos (Mafart *et al.*, 2002). Por ejemplo, para tratamientos de pasteurización Jay (1992) reporta valores de D de 0.20-2.20 min a 66°C para *Staphylococcus aureus* y D de 0.50-0.60 min a 66°C para *Coxiella burnetti*.

El concepto tradicional de $12D$, que significa la reducción de 12 ciclos logarítmicos del número inicial de microorganismos, es considerado suficiente para el procesamiento de los alimentos. El valor D se vuelve problemático cuando curvas de supervivencia semi-logarítmicas experimentalmente determinadas son claramente no lineales. La explicación común para hombros y colas en las curvas de supervivencia ha sido el considerar la presencia de sub-poblaciones de diferente resistencia, cada uno con su propia cinética de inactivación de primer orden (Peleg y Cole, 1998; Peleg y Pechina, 2000; Mafart *et al.*, 2002; Alzamora *et al.*, 2008).

En la figura 3 se muestran tres ejemplos típicos de inactivación térmica de diferentes microorganismos (van Boekel, 2002) cuando son descritos por la distribución de Weibull,

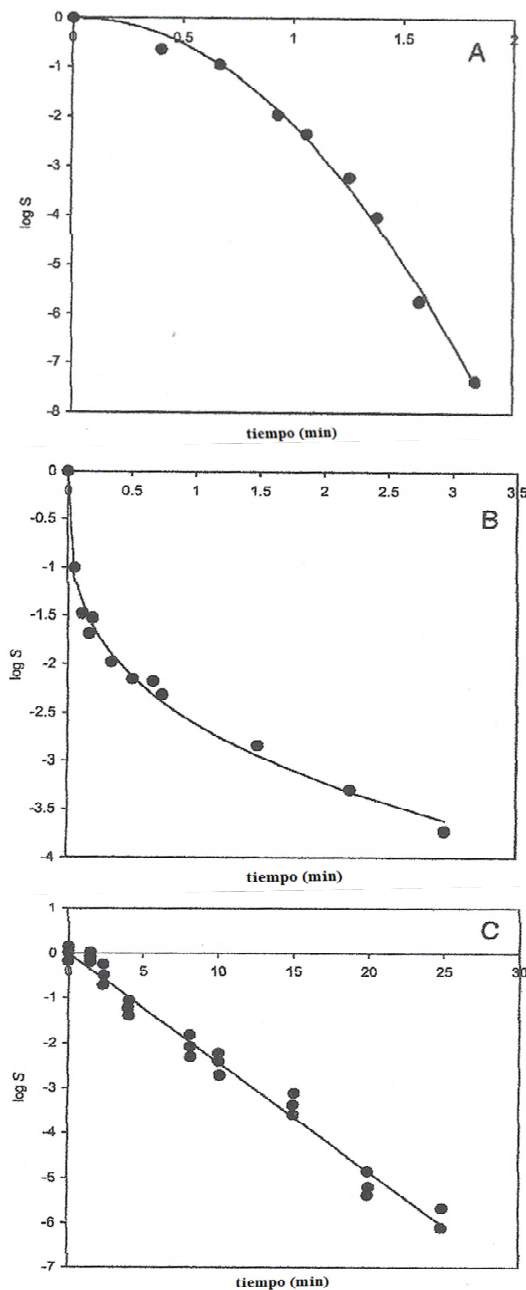


Fig. 3. Aplicaciones del modelo de Weibull: (A) inactivación de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo a 70°C; $\beta=0.46$, $n=2.1$ (Murphy *et al.*, 2000); (B) inactivación de *Salmonella enteritidis* en yema de huevo + 5% NaCl + 5% sacarosa a 64°C, $\beta=0.0025$, $n=0.3$ (Michalski *et al.*, 1999). (C) inactivación de *S. typhimurium* en carne molida a 57.2 °C, $\beta=1.78$, $n=1.0$ (Goodfellow y Brown, 1978) (Adaptada de van Boekel, 2002).

empleando valores de $n > 1$, $n < 1$ y $n = 1$. Es posible observar que los ajustes obtenidos por la distribución de Weibull son bastante aceptables y que para el caso de $n > 1$ (Fig. 3A) y $n < 1$ (Fig. 3B), en donde la tendencia no es lineal, la aplicación de la cinética de primer orden no sería adecuada.

Una de las pruebas clásicas para evaluar la aplicabilidad del modelo de Weibull consiste en una gráfica doble logarítmica de $\ln(-\ln S(X))$ en función de $\ln t$. Se establece que el modelo de Weibull aplica adecuadamente, si se obtiene una línea recta (Fig. 4). Esta prueba fue recientemente aplicada por Hutchinson (2000) para el análisis de muerte no térmica de *Escherichia coli*. Otra manera de evaluar el ajuste de un modelo, es el estudiar los residuales (la diferencia entre las predicciones del modelo y los valores experimentales) los cuales deben estar distribuidos al azar. También es frecuente usar el análisis de confiabilidad de los modelos con la prueba de la χ^2 (van Boekel, 2002).

Peleg y Cole (1998) probaron también con éxito la aplicación del modelo de distribución de Weibull para esporas de *Clostridium botulinum* y *Bacillus stearothermophilus* y células de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Similarmente, Fernández *et al.* (1999), aplicaron el mismo modelo con buenos resultados en la destrucción térmica de *B. cereus*. Este modelo presenta la principal ventaja de ser muy sencillo y suficientemente robusto para describir tanto curvas de supervivencia cóncavas hacia abajo ($n > 1$) (Fig. 5) como curvas de supervivencia cóncavas hacia arriba ($n < 1$) (Fig. 6) (Mafart *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que el modelo de Weibull puede ser más realista que la cinética de primer orden para describir la cinética de

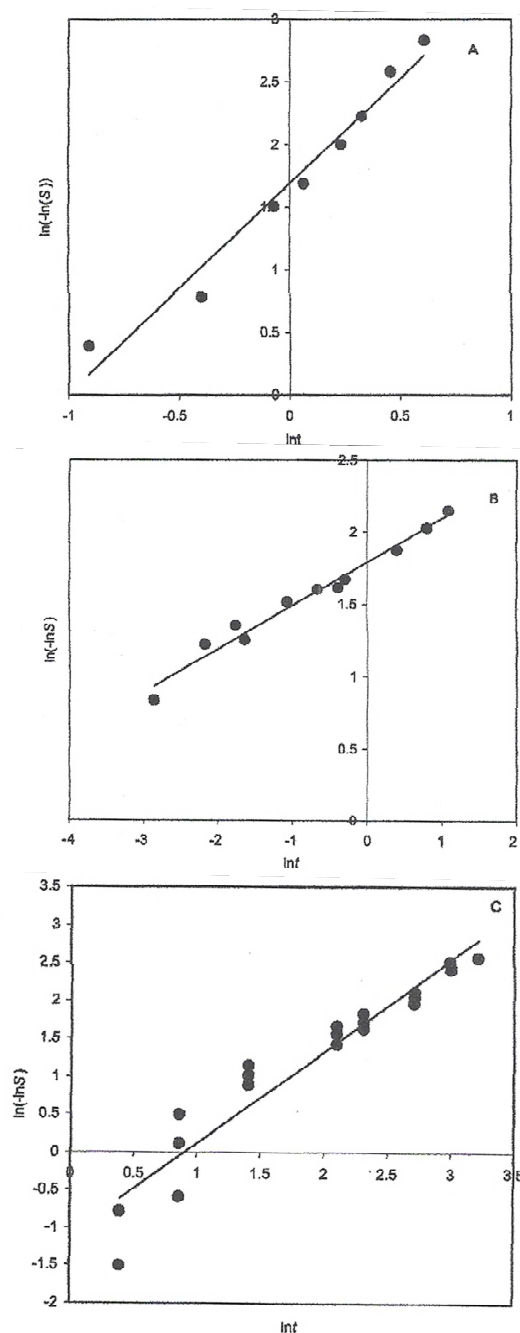


Fig. 4. Aplicabilidad del modelo de Weibull para los casos presentados en la Figura 3 (Adaptada de van Boekel, 2002).

supervivencia (Tabla I), por lo que van Boekel (2002) sugiere que éste podría establecer las condiciones de proceso. Resulta interesante mostrar las comparaciones del valor D obtenido del modelo de Weibull, ($D = \square$ en la Ecuación

13) y los valores D obtenidos a partir de la cinética de primer orden, realizadas por van Boekel (2002) (Tabla II). En esta comparación se muestra una gran diferencia entre los valores D de la cinética de primer orden, comparados con el obtenido con el modelo de Weibull.

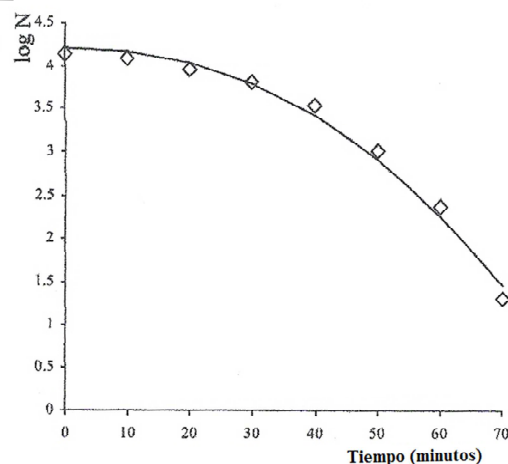


Fig. 5. Ajuste con la ecuación 8 con datos de Mafart *et al.* (2002) de la cinética de muerte de *B. pumilus* calentado a 89°C (Adaptada de Mafart *et al.*, 2002).

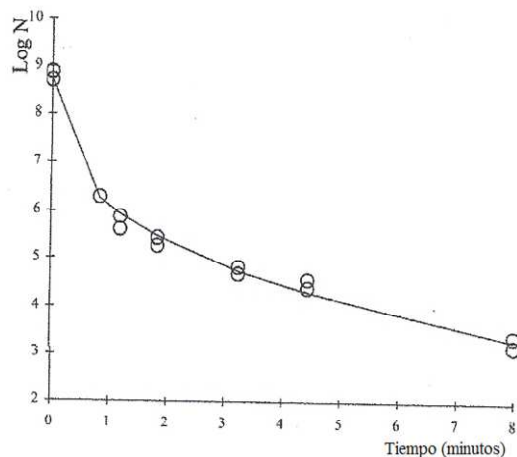


Fig. 6. Ajuste con la ecuación 8 con datos de Anderson *et al.* (1996) de la cinética de muerte de *C. botulinum* calentado a 111°C (Adaptada de Mafart *et al.*, 2002).

Los datos mostrados en la Tabla II indica que es muy relevante usar el modelo de

Weibull en lugar de los valores clásicos de D , ya que éstos pueden causar tanto subprocesamiento como sobreprocesamiento (van Boekel, 2002). De hecho, si el modelo de Weibull puede ser extrapolado, se hace aún posible considerar un tiempo térmico de muerte absoluto para los casos donde el parámetro de forma n es > 1 (probablemente la mayoría de los casos), como es reportado por Peleg (2000).

Por otra parte, López-Malo *et al.* (2002), probaron la aplicabilidad de la ecuación 6 del modelo de Fermi a curvas de respuesta a la dosis antimicrobiana de *Aspergillus flavus* (Figuras 7 y 8). Los parámetros de regresión y los parámetros del modelo, X_c y k , se

presentan en la Tabla III. El ajuste fue evaluado con criterio estadístico ($r > 0.90$), siendo éste bastante satisfactorio para este caso. A partir de estos datos se concluye que el modelo de Fermi es un modelo que puede ser usado para describir y comparar modelos de inhibición. Dado que el ajuste es adecuado, esto permite comparar el efecto de los distintos factores (pH y concentración del agente antimicrobiano) y sus dosis, en la supervivencia de los microorganismos. Por ejemplo, en la figura 7 el modelo permite observar el efecto de la disminución del pH en la inactivación del microorganismo en estudio, y en la figura 8 permite comparar el efecto de tres diferentes tipos de agentes antimicrobianos naturales utilizados en la reducción de la población microbiana.

Tabla I. Resultados con $\pm 95\%$ intervalos de confianza del ajuste del modelo de Weibull a los datos reportados *

| Caso no. | Microorganismo | Medio de calentamiento | T(°C) | β (min) | n | Fuente |
|----------|----------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------|----------------|----------------------------|
| 1 | <i>Streptococcus faecalis</i> | carne de pollo molida | 60 | 19.3 \pm 4.3 | 1.5 \pm 0.2 | Ott <i>et al.</i> , 1961 |
| 2 | <i>Listeria monocytogenes</i> | carne de res picada | 55 | 30.6 \pm 11.1 | 1.8 \pm 0.5 | Mackey y Derrick, 1990 |
| | | | 70 | 0.2 \pm 0.05 | 1.6 \pm 0.3 | |
| 3 | <i>Escherichia coli</i> | cerveza sin alcohol | 56 | 1.3 \pm 0.4 | 1.5 \pm 0.3 | L'Anthoën e Ingledew, 1996 |
| 4 | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | solución acuosa, $a_w = 0.963$ | 50 | 25.7 \pm 3.8 | 0.6 \pm 0.09 | Jermimi, 1986 |
| 5 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | cerveza | 51 | 22.1 \pm 1.3 | 2.9 \pm 0.4 | L'Anthoën e Ingledew, 1996 |

*Adaptada de van Boekel (2002)

Tabla II. Comparación del tiempo (min) necesario de calentamiento para alcanzar una reducción 7D y 12 D en el número de células usando el clásico valor D y el modelo de Weibull, respectivamente *

| Caso no. | T (°C) | Concepto 7D basado en el valor D^a | Concepto 7D basado en el modelo de Weibull | Concepto 12D basado en el valor D^a | Concepto 12D basado en el modelo de Weibull |
|----------|--------|--------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1 | 60 | 94.5 | 123.1 | 162 | 176.4 |
| 2 | 55 | 147 | 143.4 | 252 | 193.4 |
| | 70 | 0.7 | 1.1 | 1.2 | 1.6 |
| 3 | 56 | 5.3 | 6.5 | 9 | 12.7 |
| 4 | 50 | 560 | 2643 | 960 | 6490 |
| 5 | 51 | 78.4 | 57.6 | 134.4 | 69.4 |

El no. de caso corresponde a los referidos en la Tabla I

^aComo fue publicado en el artículo original

*Adaptada de van Boekel (2002)

Se pueden observar diferencias en los valores obtenidos de X_c y k para cada agente antimicrobiano evaluado, donde a mayor valor de X_c , menor es el efecto del agente antimicrobiano. Así también se puede observar que el incremento de la concentración del agente antimicrobiano en el caso del eugenol tiene un efecto significativo en la inactivación de *A. flavus*, ya que sus valores de k son pequeños, en comparación con los valores de k de la vainillina y el citral (Tabla III y Fig. 8). Por lo tanto, los parámetros de Fermi, X_c y k , resultan de gran utilidad para comparar el efecto de distintos factores (pH y concentración del agente antimicrobiano).

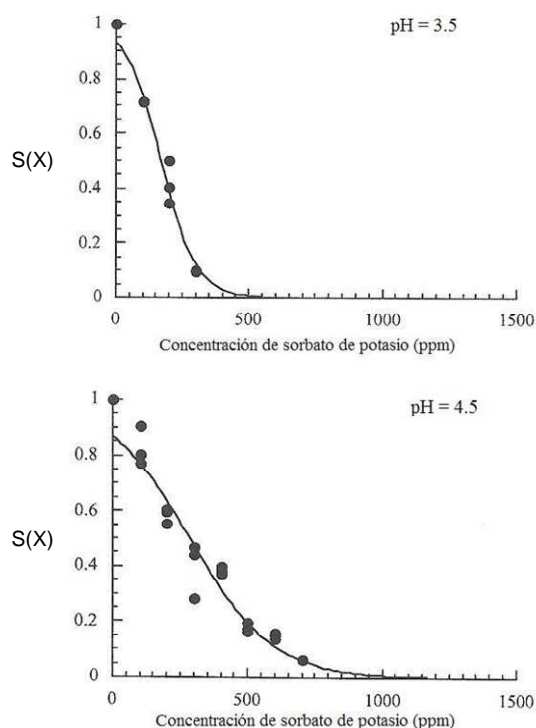


Fig. 7. Curva de respuesta a la dosis de *A. flavus* en agar papa dextrosa formulado con a_w 0.99, pHs seleccionados (3.5 o 4.5) y sorbato de potasio. Los círculos son datos experimentales; las líneas son el ajuste con el modelo de Fermi (Adaptada de López-Malo *et al.*, 2002).

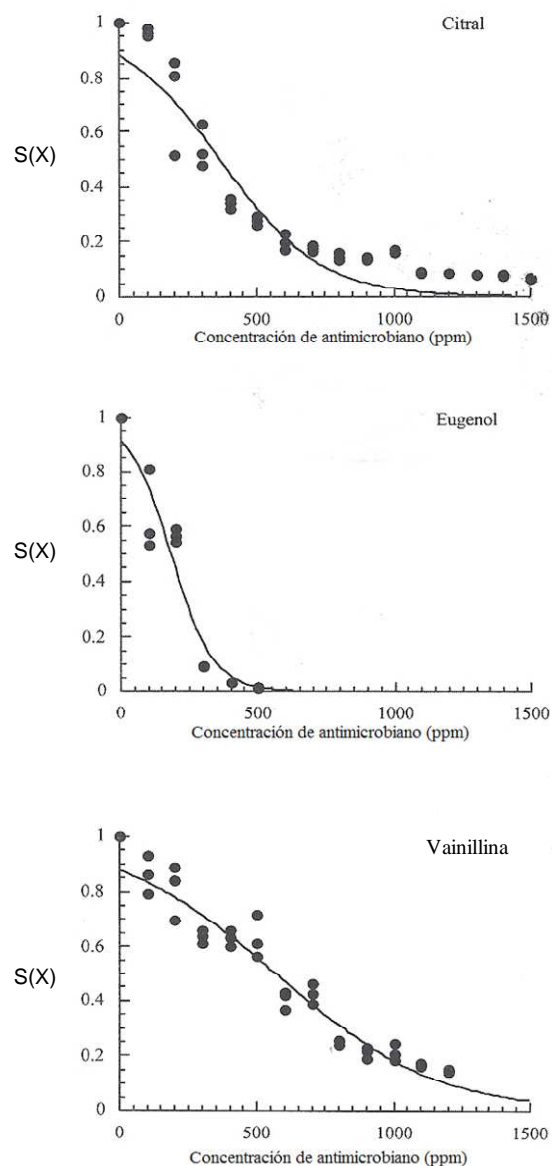


Fig. 8. Curva de respuesta a la dosis de *A. flavus* en agar papa dextrosa formulado con actividad de agua (a_w) 0.99, pH 3.5, y antimicrobianos seleccionados. Los círculos son datos experimentales; las líneas son el ajuste con el modelo de Fermi (Adaptada de López-Malo *et al.*, 2002).

Tabla III. Parámetros de regresión del modelo de Fermi aplicado en inactivación de *A. flavus* con antimicrobianos seleccionados en agar papa dextrosa formulada con a_w de 0.99 y diferentes pHs*

| Antimicrobiano | pH | X_c (ppm) | k (ppm) | r^2 |
|--------------------|-----|----------------|--------------|-------|
| Vainillina | 4.5 | 720±27 | 328±30 | 0.928 |
| | 3.5 | 567±17 | 289±18 | 0.969 |
| Eugenol | 4.5 | 212±12 | 51±11 | 0.958 |
| | 3.5 | 182±13 | 77±13 | 0.952 |
| Citral | 4.5 | 251±23 | 175±24 | 0.900 |
| | 3.5 | 364±18 | 181±18 | 0.945 |
| Sorbato de potasio | 4.5 | 285±13 | 151±14 | 0.969 |
| | 3.5 | 170±6 | 66±6 | 0.987 |

*Coeficiente de regresión

*Adaptada de López-Malo *et al.* (2002)

Conclusiones

Los modelos de distribución de Weibull y Fermi son convenientes para describir curvas de supervivencias logarítmicas lineales y no lineales. Sin embargo, existe poca información publicada en revistas científicas acerca de la aplicación de los modelos predictivos de curvas de respuesta a la dosis en tratamientos de agentes no convencionales y en combinación. Además muy pocas investigaciones comparan la aplicabilidad de los distintos modelos que se han desarrollado.

Actualmente se están desarrollando modificaciones a las ecuaciones matemáticas de los modelos para obtener parámetros que puedan compararse con los valores tradicionales de cinética de primer orden, como son el valor D y z . Esto significa que todavía hay necesidad para la optimización de procesos y de productos empleando mejores modelos de inactivación que los valores clásicos D y z .

Aunque el modelo clásico de inactivación de primer orden ha sido exitoso en el pasado de la industria de enlatado, puede conducir a dificultades a la industria de alimentos en las actuales tendencias de procesados mínimos

para garantizar la seguridad microbiana y por consiguiente mejorar la calidad de los alimentos.

Evaluar con mayor exactitud las curvas de supervivencia microbiana resultaría en un mejor entendimiento de los procesos que se aplican a los alimentos para su conservación.

Referencias

- Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., López-Malo, A., Palou, E., Char, C. D., y Raffellini, S. 2008. Models for microorganism inactivation: application in food preservation design. En "Processing Effects on Safety and Quality of Foods". E. Ortega (ed.). Taylor and Francis. Estados Unidos. En prensa.
- Anderson, W.F., McClure, A., Baird-Parker, A. C. y Cole, M.B. 1996. The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B at temperatures below 121.1°C. *Journal of Applied Bacteriology*. 80(3): 283-290.
- Chick, H. 1908. An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene*. Cambridge University Press. 8(1): 92-158.
- Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N. Mafart, P. y Leguerinel, I. 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology*. 101:73-81.
- Fernández, A., Salmeron, C., Fernández, P. S. y Martínez, A. 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strain of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology*. 10(4):158-162.
- Goodfellow, S. J. y Brown, W. L. 1978. Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. *Journal of Food Protection*. 41: 598-605.
- Guerrero, S., Tognon, M. y Alzamora, S. M. 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Journal of Food Protection*. 16 (2): 131-140.

- Heldman, D. R. y Newsome, R. I. 2003. Kinetic models for microbial survival during processing. *Food Technology*. 57(8): 40-100.
- Hutchinson, T. P. 2000. Graphing the death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 62(1): 77-81.
- Jay, J. 1992. Modern Food Microbiology. 4a. Edición. Chapman & Hall, New York. Pg. 701.
- Jermiñi, M. F. G. 1986. Osmotolerant Yeasts – Their detection, isolation and properties related to food processing. Swiss Federal Institute of Technology (ETH). Zurich. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 139.
- Körmendy, I. y Körmendy, L. 1997. Considerations for calculating heat inactivation processes when semilogarithmic thermal inactivation models are nonlinear. *Journal of Food Engineering*. 34(1): 33-40.
- L'Anthoën, N. C. e Ingledew, W. M. 1996. Heat resistance of bacteria in alcohol free beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 54(1): 32-36. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M., y Palou, E. 2002. *Aspergillus flavus* dose response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*. 73(2): 213-218.
- Mackey, B. M. y Derrick, C. M. 1990. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Letters in Applied Microbiology*. 10(6): 251-255. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. y Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*. 72(1): 107-113.
- Michalski, C. R., Brackett, R. E., Hung, Y. C. y Eizeke, G.O.I. 1999. Use of capillary tubes and plate heat exchanger to validate U.S. Department of Agriculture pasteurization protocols for elimination of *Salmonella enteritidis* from liquid egg products. *Journal of Food Protection*. 62: 112-117.
- Murphy, R. Y., Marks, B. P., Johnson, E. R. y Johnson, M.G. 2000. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat and liquid medium. *Journal of Food Research International*. 32: 375-379.
- Ott, T. M., El-Bisi, H. M. y Esselen, W. B. 1961. Thermal destruction of *Streptococcus faecalis* in prepared frozen foods. *Journal of Food Science*. 26(2): 1-10. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- Peleg, M. 1999. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*. 32(4): 271-278.
- Peleg, M. 2000. Microbial survival curves – the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International*. 33(7): 531-538.
- Peleg, M. 2006. “Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems. Models for predicting growth and inactivation”. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Ratón, Florida. Pg. 417.
- Peleg, M. y Cole, M. B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(5): 353-380.
- Peleg, M., Normand, M. D. y Damrau, E. 1997. Mathematical interpretation of dose-response curves. *Bull. Math. Biol.* 59(4): 747-761.
- Peleg, M. y Pechina, C. M. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(2):159-172.
- van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- Whiting, R. C. 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35(6): 467-494.