



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad Ingeniería Agrícola - Programa de Magister en Ingeniería Agrícola

**Ajuste de modelos matemáticos no lineales y su uso
en cinéticas de inactivación de *Escherichia coli* ATCC
25922 inoculada en jugo de zanahoria por medio de
pasteurización asistida con ultrasonido**

Tesis para optar al grado de Magister en Ingeniería Agrícola
mención Agroindustrias

PAULA ALEJANDRA ALBORNOZ URRUTIA
CHILLÁN-CHILE
2015

Profesor Guía: Pedro Melín Marín
Dpto. de Agroindustrias, Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Ajuste de modelos matemáticos no lineales y su uso en cinéticas de inactivación de *Escherichia coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria por medio de pasteurización asistida con ultrasonido

Aprobado por:

Pedro Santiago Melín Marín
Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Dr. (c)

Profesor Guía

Jerónimo Peredes Cáceres
Licenciado en Matemáticas, M. Sc. Dr.

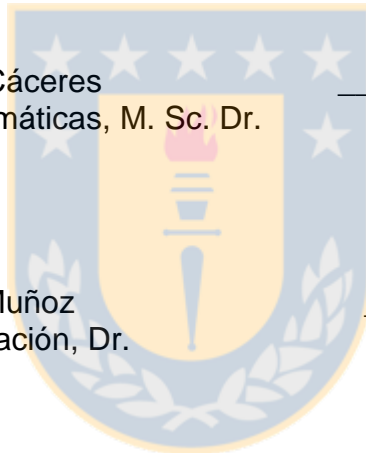
Evaluador Interno

Pedro Aqueveque Muñoz
Licenciado en Educación, Dr.

Evaluador Interno

María Eugenia González Rodríguez
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.

Directora Programa



ÍNDICE DE MATERIAS

	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMARY.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVOS.....	6
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
8. CONCLUSIÓN.....	22
9. BIBLIOGRAFÍA.....	23
10. APÉNDICE.....	27



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Parámetros cinéticos de diferentes modelos para <i>E. coli</i> ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos.....	19
Tabla 2: Tiempo de reducción decimal T_{5-D} en <i>E. coli</i> ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria pasteurizado con tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos.....	21
Tabla 3: Factor de Ajuste (B_f), factor de exactitud (A_f), SSE, RMSE y R^2 de Log (N) estimados frente a los observados para cada modelo matemático.....	22



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria (pH 6,52 y 9,23 °Brix). (A) Expuesta a tratamientos térmicos a 40, 50 y 60 °C. (B) Expuesta a tratamientos térmicos y combinado con ultrasonido a 40, 50 y 60 °C.....	15
Figura 2: Cinéticas de inactivación para <i>E. coli</i> ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos, utilizando cuatro modelos no lineales.....	20



**AJUSTE DE MODELOS MATEMÁTICOS NO LINEALES Y SU USO EN
CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN DE *Escherichia coli* ATCC 25922
INOCULADA EN JUGO DE ZANAHORIA POR MEDIO DE PASTEURIZACIÓN
ASISTIDA CON ULTRASONIDO**

Palabras claves: *E. coli* ATCC 25922, modelo, pasteurización, ultrasonido, jugo de zanahoria.

RESUMEN

Células de *E. coli* ATCC 25922 suspendidas en jugo de zanahoria fueron tratadas térmicamente a 40, 50 y 60 °C y con termosonicación (40 KHz) a las mismas temperaturas. Dentro del período de tiempo (30 min) y rango de temperaturas usadas en este estudio, se observaron curvas de inactivación no lineales. Por ello, las cinéticas de inactivación fueron evaluadas utilizando cuatro modelos no lineales. De los cuales, los modelos Gompertz modificado y Bifásico lineal, comparado a los otros modelos no lineales evaluados presentó mejor ajuste y validación de datos en la inactivación de *E. coli* ATCC 25922, con valores de R^2 de 0,9973 y 0,9969 para las curvas que presentaron fase de latencia y sección de cola. En el caso de las curvas sin sección de cola los valores de R^2 fueron 0,9725 y 0,9762, respectivamente. La reducción de 5 ciclos log en el tratamiento de termosonicación (60 °C 40 KHz) se logró en 0,6 veces el tiempo utilizado por el tratamiento de térmico (60 °C).

**ADJUSTMENT OF NONLINEAR MATHEMATICAL MODELS AND THEIR
USE IN KINETIC INACTIVATION *Escherichia coli* ATCC 25922
INOCULATED IN CARROT JUICE BY ULTRASOUND ASSISTED
PASTEURIZATION**

Keywords: *E. coli* ATCC 25922, model, pasteurization, ultrasound, carrot juice.

SUMMARY

Cells of *E. coli* ATCC 25922 suspended in carrot juice were heat treated at 40, 50 and 60 °C and thermosonicated (40 kHz) at the same temperatures. Within the period of time (30 min) and temperature range used in this study, inactivation curves were observed as nonlinear behavior. Therefore, inactivation kinetics parameters were evaluated using four nonlinear models. Results showed that the modified Gompertz and Biphasic Lineal models, showed better fit and data validation data in the inactivation of *E. coli* ATCC 25922, compared to other nonlinear models evaluated, R^2 values of 0.9973 y 0.9969 values for those with shoulder and tail type shapes, while R^2 values of 0.9725 y 0.9762 respectively were for no-tail type shape curves. Reduction of 5 log cycles in thermosonicated treatment (60 °C 40 kHz) was achieved in 0.6 times the time taken by the corresponding thermal treatment (60 °C).

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas principales que se presentan en la ingeniería alimentaria es la destrucción de los microorganismos presentes en los alimentos, no solo prevenir su potencial contaminante, sino también con el objetivo primordial de preservar los alimentos durante periodos de tiempo lo más largo posible. Para conseguir la destrucción de las formas esporuladas y vegetativas, los alimentos son tratados térmicamente, envasándose posteriormente en un envasado aséptico. El principal interés es obtener un producto final de alta calidad, minimizando las pérdidas de nutrientes y propiedades sensoriales (Arthey y Dennis 1992).

La creciente demanda en los consumidores de alimentos nutritivos, ha dado como resultado, una mayor aplicación de tecnologías no térmicas para el procesamiento de alimentos. Estas tecnologías han sido investigadas por su potencial para reducir al mínimo los cambios en las propiedades organolépticas y nutritivas de los productos. Las nuevas técnicas de conservación que se han desarrollado, podrían eliminar la actividad microbiana, al mismo tiempo reducir significativamente o completamente los requerimientos de calor. Estos procesos son, en su mayor parte, energía menos intensiva y por lo tanto, más rentable y ambientalmente amigable más que el procesado térmico convencional (Hancock and Stewart, 2010).

El jugo de zanahoria es una bebida popular y ampliamente aceptada como una fuente importante de componentes saludables como carotenoides, vitaminas y compuestos fenólicos que promueven la actividad antioxidante en los seres humanos al reducir drásticamente la actividad de los radicales libres. (Gonçalves et al., 2010; Ma et al., 2013; Torregrosa et al., 2006). Sin embargo, el tiempo de almacenaje de este producto es corto debido a su baja acidez, lo que conduce a su deterioro limitando su almacenamiento (Torregrosa et al., 2006). Por otra parte, las hortalizas suelen estar contaminados con agentes patógenos tales como, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, entre otros, que pueden ser transmitidos al hombre a través de los alimentos (Degirmenci et al.,

2012). Por ello, que el uso de tratamientos térmicos a altas temperaturas son utilizados frecuentemente para reducir las cargas microbianas en jugos de vegetales, logrando extender la vida de almacenaje (Hancock and Stewart, 2010). No obstante, muchos de estos procesos térmicos tienen la desventaja de disminuir el contenido de nutrientes presentes (Piyasena et al., 2003). Por esta razón, se investiga constantemente el desarrollo de nuevas tecnologías para asegurar la inocuidad microbiológica y extender la vida de almacenaje de muchos productos y entre ellos, el jugo de zanahorias.

La técnica de ultrasonido de baja frecuencia, (20 – 100 KHz) y alta potencia (10 – 1000 W/cm²) ha sido una innovadora tecnología de pasteurización, debido al efecto que las ondas de ultrasonido, a nivel intracelular, provocan la fractura de la membrana celular y muerte de los microorganismos (Feng and Yang, 2006; Mason et al., 1996). Sin embargo, el ultrasonido por sí solo no es muy efectivo en la inactivación microbiana (Cheng et al., 2007; Hancock and Stewart, 2010; Valero et al., 2007). Por esto el uso de tratamientos combinados con calor (termo-sonificación) o presión (nano-sonificación) pueden mejorar la inactivación microbiológica durante el proceso de pasteurización de alimentos y al mismo tiempo disminuir los requerimientos de calor. Numerosos estudios han reportado el efecto de reducción microbiológica utilizando tratamientos térmicos combinados con ultrasonido (Piyasena et al., 2003; Ugarte-Romero et al., 2006; Zenker et al., 2003).

Para demostrar la inocuidad microbiológica en un alimento, es necesario establecer las condiciones de procesamiento que aseguren la efectividad del proceso de termosonicación en la inactivación de patógenos, para ello hay que basarse en una buena estimación de los parámetros cinéticos obtenidos de curvas de supervivencia. Inicialmente, en la mayoría de los casos la tasa de destrucción térmica de la población microbiana sigue cinéticas de primer orden (Singh and Heldman, 1997), sin embargo, últimamente se han observado importantes desviaciones en las curvas de supervivencia que incluyen períodos

de retraso (hombros), seguido de una inactivación exponencial, al igual que sección de células remanentes (colas) (Peleg and Cole, 2010).

En estudios previos, varias ecuaciones logísticas han sido empleadas. Cerf (1977) propuso un modelo que describe curvas bifásicas de dos subpoblaciones de bacterias con distintas resistencia al tratamiento. Este modelo fue usado en la cinética de destrucción termal de esporas de *A. niger* (Fujikawa and Itoh, 1996) y *Salmonella enteritidis* (Humpheson et al., 1998). Posteriormente, Whiting y Buchanan (1992) desarrollaron una ecuación logística para describir hombros y colas significantes en curvas de supervivencia, este modelo fue aplicado en inactivación de *L. monocytogenes* (Buchanan et al., 1994), *S. aureus* (Whiting et al., 1996). Curvas de supervivencias no lineales han sido modeladas usando el modelo de Gompertz modificado, inicialmente este modelo ha sido descrito para curvas con forma sigmoideas asimétricas de crecimiento (Zwietering et al., 1990), luego este modelo no lineal fue demostrado para curvas de inactivación en *L. monocytogenes* Scott A en leche para lactantes (Linton et al., 1995).

Es por esto, que el estudio de la cinética de muerte microbiológica debe ser ratificado mediante modelos más precisos en la descripción de los fenómenos antes mencionados. Este trabajo describe la aplicación de modelos no lineales a la inactivación de *E. coli* ATCC 25922 como cepa de referencia durante el proceso de pasteurización apoyada con ultrasonido.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO

Es posible predecir la evolución del comportamiento cinético de *E. coli* inoculado en jugo de zanahorias (*Daucus carota L.*) mediante la modelación matemática de destrucción termal y con apoyo de ultrasonido

3. OBJETIVOS.

Objetivo general

Evaluar la aplicación de modelos matemáticos no lineales en la cinética de inactivación de *E. coli* inoculado en jugo de zanahoria

Objetivos Específicos

- Colectar datos de inactivación termal y termal asistida con ultrasonido en jugo de zanahoria inoculada con *E. coli* ATCC 25922.
- Evaluar la aplicación de modelos matemáticos no lineales a los datos colectados y determinar la bondad de ajuste mediante parámetros estadísticos.
- Determinar el efecto de la aplicación de los modelos en el cálculo de los parámetros cinéticos de muerte termal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos experimentales de curvas de inactivación microbiológica

Los datos experimentales que se utilizaron en la evaluación de modelos matemáticos no lineales para describir las curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 25992, fueron obtenidas a partir del trabajo realizado por Albornoz (2014), que consistió en evaluar la inactivación de dicha bacteria, utilizando como sustrato jugo de zanahoria, evaluando tratamientos térmicos y tratamientos térmicos asistidos con ultrasonido (datos experimentales en APÉNDICE 2).

Nota: A diferencia de los datos analizados en la anterior investigación, en el presente trabajo se analizaron datos tomados a una mayor frecuencia (detalle de la metodología en APÉNDICE 1).

Modelos matemáticos no lineales para curvas de inactivación microbiológica

A continuación se presentan 4 modelos matemáticos no lineales, estos modelos fueron usados para ajustar las curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 para describir la cinética de inactivación microbiológica observada (detalle desarrollo matemático en APÉNDICE 4).

- (i) Modelo bifásico lineal, inicialmente es un modelo de tres parámetros, en este se asume que la población se divide en dos subpoblaciones, una sensible y otra resistente al tratamiento (Ec. 1). Donde $N(t)$ (log UFC/ml) representa la concentración de células en el tiempo t , N_0 (log UFC/ml) es la concentración inicial de células. El parámetro f es la fracción de la población inicial considerada población mayor y, $(1 - f)$ es la fracción de la población inicial considerada como subpoblación menor y más resistente al calor que la subpoblación mayor. Los parámetros k_1 y k_2 son la velocidad específica de inactivación para las subpoblaciones respectivamente (Cerf, 1977).

Xiong et al. (1999b), propusieron una modificación al modelo bifásico (Cerf, 1977), agregando el parámetro t_{lag} que describe el tiempo de latencia o periodo de hombro en las curvas de inactivación y posteriormente evaluar el modelo en una función por tramos (Ec. 2).

$$\text{Log} \frac{N(t)}{N_0} = \text{Log}(fe^{-k_1 t} + (1-f)e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

$$\text{Log} \frac{N(t)}{N_0} = \begin{cases} 0 & t \leq t_{lag} \\ \text{Log}(fe^{-k_1(t-t_{lag})} + (1-f)e^{-k_2(t-t_{lag})}) & t \geq t_{lag} \end{cases} \quad (2)$$

- (ii) Modelo de Whiting–Buchanan, es un modelo logístico, de cuatro parámetros, considera el efecto significativo de hombros y colas en las curvas de supervivencia, tal como se describe en la Ec. 3. El parámetro f es la fracción de la población inicial considerada población mayor y, $(1-f)$ es la fracción de la población inicial considerada como subpoblación menor y más resistente al calor que la subpoblación mayor. Los parámetros b_1 y b_2 son la tasa de inactivación para las subpoblaciones respectivamente, t_{lag} es la duración de la fase latencia y toma valor de 0 en casos que la curva no presente fase lag (Buchanan et al., 1994; Whiting, 1993).

$$\text{Log} \frac{N(t)}{N_0} = \text{Log} \left(\frac{f(1 + e^{-b_1 t_{lag}})}{1 + e^{b_1(t-t_{lag})}} + \frac{(1-f)(1 + e^{-b_2 t_{lag}})}{1 + e^{b_2(t-t_{lag})}} \right) \quad (3)$$

- (iii) Modelo de Gompertz modificado, desarrollado originalmente para curvas de crecimiento (Zwietering et al., 1990), luego fue demostrado en curvas de inactivación de microorganismos (Gil et al., 2006; Linton et al., 1995; Xiong et al., 1999a).

$$\text{Log} \frac{N(t)}{N_0} = Ce^{-e^{BM}} - Ce^{-e^{-B(t-M)}} \quad (4)$$

Donde N (UFC/ml) representa la concentración final de células; B es la velocidad de muerte relativa a M (1/unidad de tiempo); C es la diferencia

entre el valor más alto y más bajo de la asíntota (UFC/ml); M es el tiempo (min) en el cual la velocidad absoluta de muerte es máxima; el signo menos antes del parámetro C significa inactivación de microorganismos; t es el tiempo (min).

De los parámetros de la función sigmoidea de Gompertz es posible obtener parámetros cinéticos relacionados con el crecimiento de microorganismos tales como, velocidad máxima de crecimiento (Ec. 5) y tiempo de latencia (Ec. 6). (Xiong et al., 1999a; Zwietering et al., 1990).

$$\mu_{\max} = \frac{BC}{e} \quad (5)$$

$$t_{lag} = M - \frac{1}{B} + \frac{\log N_0 - A}{\frac{BC}{e}} \quad (6)$$

- (iv) Modelo de Baranyi, originalmente descrito para curvas de crecimiento (Baranyi and Roberts, 1994; Baranyi et al., 1993). Posteriormente se desarrolló este modelo para caracterizar curvas de inactivación microbiana (Ec. 7).

Donde N y N_0 (Log UFC/ml) son el número de microorganismos presentes al tiempo t y al inicio respectivamente. El parámetro μ_{\max} es la tasa relativa de muerte máxima. El signo menos representa inactivación de microorganismos.

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = -\mu_{\max} \alpha(t)\beta(t)N & (N > 0; t > 0) \\ N(0) = N_0 & (N_0 > 0; t = 0) \end{cases} \quad (7)$$

Xiong et al. (1999a), proponen los siguientes términos para definir $\alpha(t)$ y $\beta(t)$, que describen la función de ajuste de la sección de hombros y la sección de cola, respectivamente, en curvas de inactivación, los cuales se definen de la siguiente forma:

$$\alpha(t) = 1 - \frac{r^n}{r^n + t^n} \quad (8)$$

$$\beta(t) = 1 - \frac{N_{\min}}{N} \quad (9)$$

En la función $\alpha(t)$ el parámetro n toma valores enteros positivos ($n = 1, 2, \dots, 6$) y se utiliza para describir la curvatura que describe la fase de latencia; el parámetro r es el tiempo requerido para que la velocidad de muerte relativa alcance la mitad de μ_{\max} .

Además, se tiene que:

$$B(t) = \int_0^t \alpha(t) dt \quad (10)$$

Luego de reemplazar en la Ec. 7 y resolver el P.V.I, se obtiene que (Xiong et al., 1999a):

$$\text{Log} \frac{N(t)}{N_0} = \text{Log} \left(q_B - (1 - q_B) e^{-\mu_{\max}(t - B(t))} \right) \quad (11)$$

El término q_B describe el segmento de cola, se define como $q_B = (N_{\min} / N_0)$, donde N_{\min} es la mínima concentración de células remanentes en la fase de cola. Cuando $q_B = 0$, significa que no hay fase de cola.

Tiempo de reducción decimal D

El tiempo de reducción decimal D, se define como el tiempo de tratamiento necesario para que el número de microorganismos se reduzca a una décima parte (Singh and Heldman, 1997). El valor T_{m-D} es el tiempo requerido para reducir m ciclos-log de bacterias bajo condiciones dadas. En estudios similares, se utilizó $m = 4$ (T_{4-D}), reducción de 4 ciclos log, como indicador de inactivación suficiente, para microorganismos patógenos en medios líquidos (Buchanan et al., 1994; Xiong et al., 1999b). Normas de HACCP actuales requieren que se logre una reducción de 5 ciclos log de un patógeno durante el procesamiento de

jugos de frutas (US Food and Drug Administration, 2004). Por ello, en este estudio se utilizó como parámetro indicador de la efectividad del tratamiento, T_{5-D} . El T_{5-D} , se determinó mediante el método Newton-Raphson, el cual se programó en Matlab.

Evaluación y validación de los modelos

Las curvas experimentales de inactivación fueron ajustadas con los modelos mencionados anteriormente, a través de programación en Matlab de algunas subrutinas que fueron acopladas al *curve fitting tool* de Matlab. En general, la determinación de los parámetros se hizo a través de mínimos cuadrados no lineales, en particular en el *curve fitting* se utilizó el algoritmo de Levenberg-Marquardt. La bondad de ajuste de los modelos fue evaluado a través de los índices corregidos; error cuadrático medio (RMSE) (Ec. 12) y coeficiente de correlación (R^2) (Ec.13):

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{m-j}} \quad (12)$$

$$R^2 = 1 - \frac{(m-1)SSE}{(m-j)SST} \quad (13)$$

Donde SSE es el error cuadrático acumulado, SST es la dispersión de los datos respecto de su media, m es el número de observaciones, j es el número de parámetros del modelo (Apéndice 5)

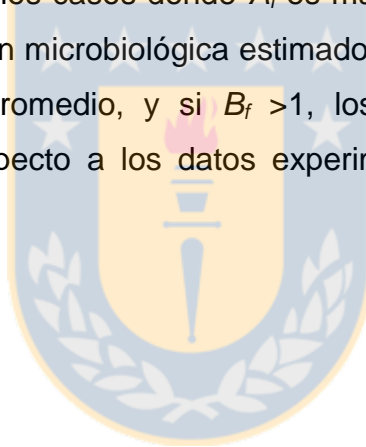
Los modelos fueron validados usando un conjunto de datos experimentales, la bondad de ajuste de los modelos se evaluó a través de los índices, factor de ajuste B_f (Ec.14) y factor de exactitud A_f (Ec. 15).

$$B_f = 10^{\frac{\sum \log\left(\frac{X_p}{X_o}\right)}{n}} \quad (14)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum \left| \log \left(\frac{X_p}{X_o} \right) \right|}{n}} \quad (15)$$

Donde X_o es el valor observado, X_p es el valor estimado por el modelo, n es el número de total de observaciones (detalle del desarrollo de ambos índices en Apéndice 5).

Estos índices determinan de forma cuantitativa el desempeño de los modelos utilizados. El factor de exactitud, A_f , muestra cuánto difieren los valores estimados de los observados, por ello A_f igual a 1, indica que existe una perfecta coincidencia entre los valores observados y los valores estimados. Valores de A_f cercanos a 1 indican que los datos estimados por el modelo son de mejor calidad que en los casos donde A_f es mayor. Por otra parte, si $B_f < 1$, los valores de inactivación microbiológica estimados en promedio por el modelo son subestimados en promedio, y si $B_f > 1$, los datos en promedio están sobreestimados con respecto a los datos experimentales observados (Ross, 1996).



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de tratamiento térmico y tratamiento térmico asistido de ultrasonido en la inactivación E. coli ATCC 25922 en jugo de zanahoria

Las figuras 1(A y B) muestran la tasa de inactivación logarítmica de *E. coli* ATCC 25922 en jugo de zanahoria expuesto a tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con ultrasonido, respectivamente. La temperatura mínima de trabajo (40 °C), no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos, y no se observó efecto de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 en el jugo de zanahoria. Luego al utilizar 50 y 60 °C para ambos tratamientos fue posible incrementar el efecto de inactivación sobre *E. coli* ATCC 25922 en conjunto con el incremento del tiempo de exposición (0 – 30 min). Al incrementar la temperatura de 50 a 60 °C por 15 min, la tasa de inactivación logarítmica fue de -0,29 y -3,77 ciclos log, respectivamente. Un mejor resultado se obtuvo utilizando el tratamiento combinado, por 15 min a las mismas temperaturas, la tasa de inactivación logarítmica fue de -2,97 y -5,31 ciclos log. Por consiguiente, se puede concluir que el incremento de temperatura combinado con ultrasonidos y tiempo de tratamiento pueden aumentar la eficiencia de la inactivación de cepas bacterianas de *E. coli*, en medios líquidos, lo que está de acuerdo con estudios previos (Lee et al., 2009; Ugarte-Romero et al., 2006; Zenker et al., 2003).

El mecanismo de inactivación sobre microorganismos se produce debido al efecto de la cavitación generada por las ondas de ultrasonidos. La cavitación produce alteraciones en la integridad de la membrana, que pueden terminar en destrucción de la membrana bacteriana (Condón et al., 2005; Mason et al., 1996). A mayor temperatura de trabajo combinado con ultrasonidos de potencia y tiempo de tratamiento se promueve el daño celular e incrementa la eficacia de la inactivación ultrasónica.

Por otro lado, las curvas de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 en jugo de zanahoria, difieren de la forma lineal; es notable la presencia de hombros y

colas en los diferentes niveles de temperatura y tipo de tratamientos (Fig. 1). Por ello, una buena alternativa, para estudiar y analizar el fenómeno de inactivación microbológica, es el uso de variados modelos matemáticos y diferentes parámetros que permitirán analizar su comportamiento.

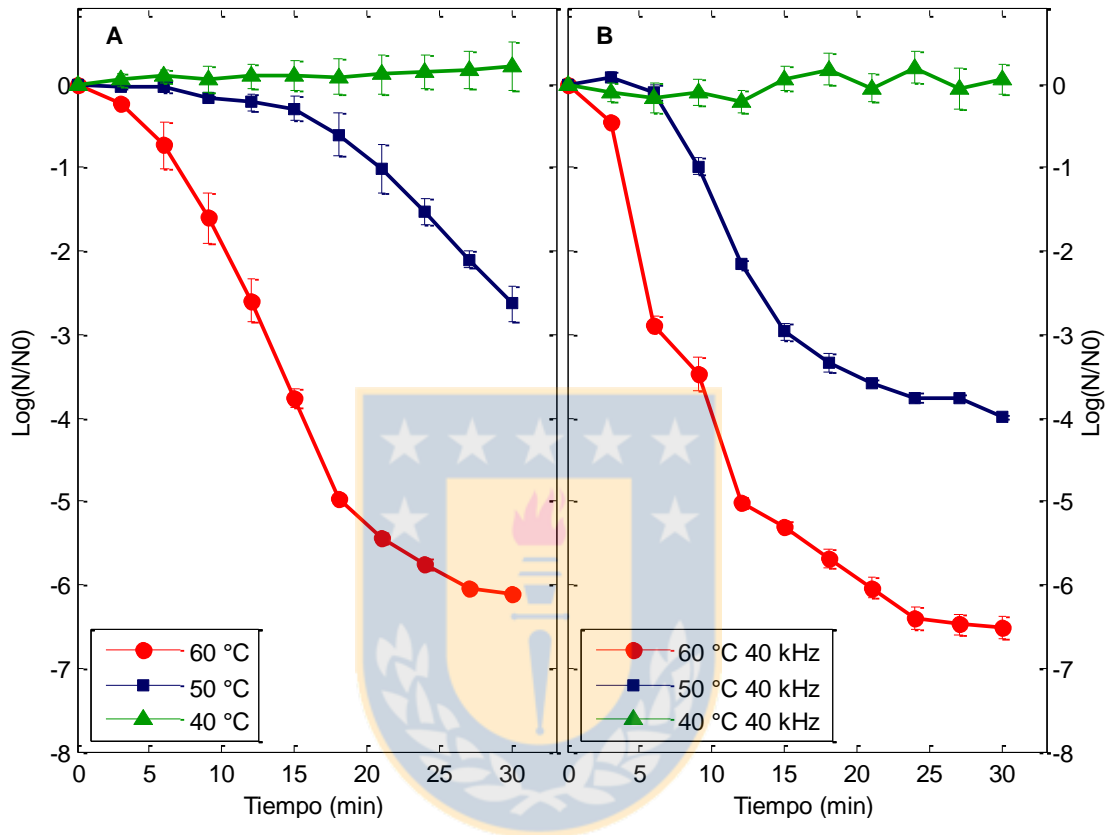


Fig. 1. Curvas de supervivencia de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria (pH 6,52 y 9,23 °Brix). (A) Expuesta a tratamientos térmicos a 40, 50 y 60 °C. (B) Expuesta a tratamientos térmicos y combinado con ultrasonido a 40, 50 y 60 °C.

Modelos de inactivación microbológica

El uso de modelos no lineales en el fenómeno de inactivación microbológica por tratamientos térmicos y/o tratamientos combinados, se realiza para representar de manera adecuada los datos observados y a partir de ahí, obtener parámetros similares al D y z, obtenidos de la representación lineal de decrecimiento microbológico, que nos permitan determinar el tiempo y temperatura que se debe utilizar para garantizar seguridad microbiana. Por otra parte, cada modelo de inactivación microbológica utilizado, tiene parámetros

que se relacionan a fenómenos físicos que suceden durante el proceso de inactivación por efecto del tratamiento aplicado y parámetros de ajuste al modelo. Estos parámetros, se detallan continuación:

Tiempo de latencia t_{lag}

El parámetro *tiempo de latencia*, t_{lag} , en el modelo Bifásico Lineal, se determinó bajo el supuesto que el crecimiento o inactivación de células al inicio es cero, por ello, se debe determinar su valor inicialmente a partir del comportamiento de los datos observados. En el modelo de Whiting–Buchanan, el t_{lag} fue entregado como un parámetro de ajuste al modelo. En el modelo Gompertz modificado, el tiempo de latencia se obtiene a partir de los parámetros C, M y B entregados por el ajuste. En cambio, el modelo de Baranyi no estima el valor de t_{lag} , sino que en su lugar utiliza una función de ajuste, B(t) (Ec. 10), que describe la fase de latencia. Por ello, en los casos de curvas con marcada zona de latencia y sección de células remanentes al final (curvas sigmoideas) la función de ajuste, B(t) que mejor describió la fase de latencia, se obtuvo cuando se utilizó $n = 6$. Luego, cuando la curva de inactivación solo tuvo fase de latencia y decrecimiento acelerado, la función B(t) tubo mejor ajuste con $n = 4$. Para las curvas de inactivación sin fase de latencia la función B(t) es cero.

Velocidad máxima de inactivación

En los modelos Bifásico Lineal y Whiting–Buchanan, la velocidad máxima de inactivación microbiológica, u_{max} , ocurre durante la inactivación de la subpoblación mayor que es sensible al tratamiento, en los casos que se observa una subpoblación resistente, la máxima velocidad de inactivación fue al menos 10 veces la velocidad observada en la subpoblación resistente. En cambio, cuando no existe una fracción de población resistente el modelo determina que existen dos subpoblaciones con tasas de inactivación similar o cercana entre sí. La velocidad máxima de inactivación es representada por los parámetros k_1 y b_1 , respectivamente. En el modelo Gompertz modificado, la velocidad máxima se obtiene a partir de los parámetros B y C entregados por el

ajuste. El modelo Baranyi entrega el valor de u_{max} directamente como uno de los parámetros del modelo.

Subpoblaciones f y $1-f$

Únicamente, los modelos Bifásico Lineal y Whiting–Buchanan se basan en la estimación de dos subpoblaciones, f y $1-f$ (Ec. 2, Ec. 3), presentes en el comportamiento de la bacteria durante inactivación. Por ello, la estimación de los parámetros se realizó mediante el ajuste lineal por tramos, a través de dos trazos rectos sobre los datos de inactivación medidos. El mejor ajuste se determinó cuando hubo el menor error cuadrático acumulado mediante técnica de mínimos cuadrados a cada subpoblación.

Sección de cola o células remanentes

La sección de cola que poseen algunas curvas es descrita en el modelo Baranyi por el parámetro q_B (Ec. 11), que representa la fracción de células presentes en la parte final de la curva. En los tratamientos donde hubo una mayor inactivación microbiana y una menor cantidad de células remanentes, se obtuvieron valores de q_B de 7,801E-07 y 3,296E-07 para el tratamiento térmico a 60 °C y tratamiento combinado a la misma temperatura, respectivamente. Luego, en el tratamiento combinado a 50 °C, donde se observó una mayor cantidad de células remanentes en el tiempo evaluado, q_B tomó valor de 1,038E-04. Por último, cuando la curva de inactivación no mostró sección de remanente, q_B tomó valor nulo, simplificando el modelo. Para los casos en que la curva de inactivación no presenta ni fase de latencia al inicio ni sección de remanente al final del tiempo de observación del ensayo, éste modelo se simplifica resultando el modelo de inactivación lineal de primer orden.

De manera análoga, el parámetro $(1-f)$ utilizado en los modelos Bifásico Lineal y Whiting–Buchanan cuantifican la población de microorganismos presentes en la sección de cola de la curva.

Parámetros cinéticos de inactivación

Los parámetros obtenidos para diferentes modelos de inactivación microbiológica son mostrados en la Tabla 1. Para evaluar el ajuste al modelo se utilizó el coeficiente de correlación (R^2) y el error cuadrático medio (RMSE). En general, valores pequeños de RMSE y valores cercanos a 1 de R^2 indican buena calidad del ajuste en cuanto a representar la dinámica evaluada.

Todos los modelos presentan desempeño deficiente en caso de las curvas con cola y sin fase de latencia (60 °C 40 KHz), haciendo notar que entre los cuatro modelos, el modelo que muestra un más bajo valor de coeficiente de correlación es Baranyi, presentando un R^2 de 0,9679.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de diferentes modelos para *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos.

Modelo	Tratamiento	Parámetros obtenidos para cada modelo				RMSE	R^2	
i	50 °C	(1-f)= 1,3536E-02	k1= 0,3751	k2= 0,3570	tl= 14,67	0,3606	0,9815	
	50 °C 40 KHz	(1-f)= 5,4907E-04	k1= 0,7601	k2= 0,0584	tl= 5,81	0,0933	0,9969	
	60 °C	(1-f)= 9,4861E-07	k1= 0,7439	k2= 0,0011	tl= 3,67	0,2405	0,9906	
	60 °C 40 KHz	(1-f)= 6,4827E-06	k1= 0,9357	k2= 0,1918	tl= 0,00	0,3400	0,9794	
ii	50 °C	(1-f)= 1,3536E-02	b_1 = 0,4315	b_2 = 0,4316	tl= 16,27	0,0751	0,9932	
	50 °C 40 KHz	(1-f)= 5,4670E-04	b_1 = 0,8539	b_2 = 0,0726	tl= 6,55	0,1152	0,9945	
	60 °C	(1-f)= 2,8862E-06	b_1 = 0,8756	b_2 = 0,0598	tl= 5,25	0,1404	0,9968	
	60 °C 40 KHz	(1-f)= 5,7611E-06	b_1 = 0,9959	b_2 = 0,1172	tl= 0,00	0,3261	0,9830	
iii	50 °C	B= 0,0983	C=5,3167	M= 26,6833	μ_{max} = 0,1988	tl=16,07	0,0728	0,9936
	50 °C 40 KHz	B= 0,2688	C=3,8433	M= 10,2233	μ_{max} = 0,3487	tl=6,65	0,0899	0,9971
	60 °C	B= 0,1838	C=6,3980	M= 11,4167	μ_{max} = 0,4068	tl=5,26	0,1337	0,9974
	60 °C 40 KHz	B= 0,1937	C=6,6958	M= 5,7167	μ_{max} = 0,5119	tl=1,55	0,3205	0,9817
iv	50 °C	q_B = 0	n=4	μ_{max} = 0,5622	r= 18,66	0,0755	0,9931	
	50 °C 40 KHz	q_B = 1,038E-04	n=6	μ_{max} = 0,6619	r= 5,15	0,2022	0,9852	
	60 °C	q_B = 7,801E-07	n=6	μ_{max} = 0,8371	r= 4,74	0,1807	0,9947	
	60 °C 40 KHz	q_B = 3,296E-07	NA	μ_{max} = 0,8965	NA	0,4247	0,9679	

NA: No aplica.

El modelo Bifásico Lineal, logra buenas estimaciones ($R^2 = 0,9906$) para las curvas con latencia y cola, y sus valores no son aceptables para el resto de las curvas. Los modelos Whiting–Buchanan, Gompertz modificado y Baranyi,

presentan buenos resultados en las estimaciones de los conjuntos de datos que muestran fase de latencia (50 °C, 50 °C 40 KHz y 60 °C).

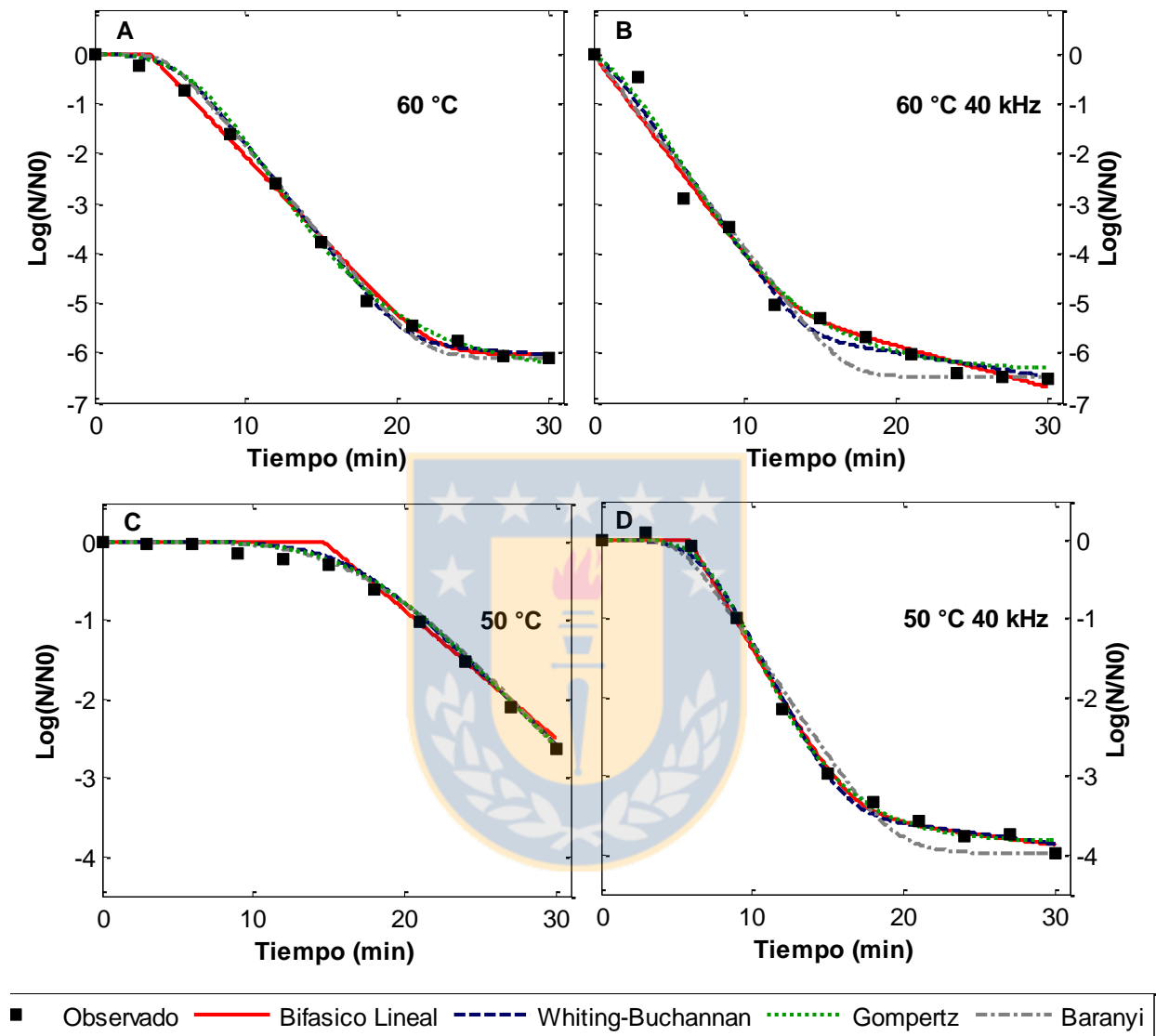


Fig. 2. Cinéticas de inactivación para *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria utilizando cuatro modelos no lineales. A) Tratamiento térmico a 60 °C. B) Tratamiento térmico a 60 °C combinado con ultrasonido (40 kHz). C) Tratamiento térmico a 50 °C. D) Tratamiento térmico a 50 °C combinado con ultrasonido (40 kHz).

Se observaron tres tipos de curvas: 1) curvas sigmoideas, es decir, curvas que presentan de forma marcada sección de hombros, sección de inactivación acelerada y sección de cola (células remanentes en la parte final) (Fig. 2A y 2D). 2) Curvas bifásicas con sólo sección de inactivación acelerada y sección

de cola (Fig. 2B). 3) Curvas bifásicas con sección de hombros prolongada, posteriormente inactivación acelerada y sin sección remanente (Fig. 2C).

En algunos casos, los valores de *tiempo de reducción decimal* resultaron mayores al tiempo máximo observado durante el ensayo, 30 min, ellos, son obtenidos a partir de la aproximación dada por el ajuste que modela los datos discretos observados. Lo anterior indica que la inactivación durante el tiempo observado fue menor a 5 ciclos log. Por ello, estos resultados obtenidos de T_{5-D} por cada modelo son la proyección o tendencia de las curvas obtenidas, por tanto no se deben considerar correctos porque no existen datos experimentales que validen estos resultados. Esto ocurrió en el tratamiento térmico a 50 °C cuando se utilizaron los 4 modelos (Tabla 2).

Luego, en el tratamiento térmico combinado con ultrasonidos a la misma temperatura, el modelo Bifásico lineal y modelo de Whiting–Buchanan presentaron este comportamiento. En cambio, los modelos de Baranyi y Gompertz modificado, debido al ajuste predicho, estos presentan en la sección final de la curva una asíntota horizontal ubicada sobre el mínimo de inactivación requerida, por ello no es posible determinar el valor T_{5-D} utilizando dichos modelos.

Tabla 2. Tiempo de reducción decimal T_{5-D} en *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria pasteurizado con tratamiento térmico y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos.

Tiempo Reducción Decimal T_{5-D} (min)					
Tratamiento	Lineal	Bifásico lineal	Whiting-Buchanan	Gompertz Modif.	Baranyi
50 °C	66,90	45,39	42,95	55,08	40,61
50 °C 40 kHz	32,45	74,35	68,16	NA	NA
60 °C	21,88	19,27	18,60	19,04	18,82
60 °C 40 kHz	17,91	13,10	12,50	13,33	12,88

NA: T_{5-D} no fue calculado debido que la mayor reducción estimada por el modelo fue menor a 5 ciclos log a 50 °C 40 KHz.

El T_{5-D} obtenido con el tratamiento térmico a 60 °C estuvo en el rango 18,60 – 19,27 min, mientras que el tratamiento térmico a 60 °C combinado con ultrasonido resultó de 12,5 – 13,33 min cuando se utilizaron los cuatro modelos no lineales.

Validación de modelos

En la validación de los modelos, se usó una serie de datos experimentales no utilizados en las regresiones y se comparó con los valores predichos respectivos de cada modelo matemático (Tabla 3). Los datos utilizados para la validación de los modelos corresponden a dos tratamientos que generan dos tipos de curvas distintas entre sí, la primera es una curva con fase de latencia y posterior inactivación (curva de inactivación a 50 °C), y la segunda, es una curva sigmoidea (curva de inactivación a 50 °C 40 KHz).

En general, los cuatro modelos utilizados en la validación, presentaron menor error cuando se aplican a curvas de tipo sigmoidea en comparación a las curvas bifásicas. El modelo Bifásico lineal presentó estimaciones aceptables en los casos donde se consideró curvas con fase de latencia y sección de cola. Por el contrario, no son aceptables en los casos donde la curva presenta latencia sin sección de cola. Lo anteriormente dicho es coherente con los resultados obtenidos en la Tabla 1.

Tabla 3. Factor de Ajuste (B_f), factor de exactitud (A_f), SSE, RMSE y R^2 de Log (N) estimados frente a los observados para cada modelo matemático.

	Bifásico lineal		Whiting-Buchanan		Gompertz modificado		Baranyi	
	50 °C	50 °C 40 kHz	50 °C	50 °C 40 kHz	50 °C	50 °C 40 kHz	50 °C	50 °C 40 kHz
B_f	1,0121	1,0013	1,0106	0,9993	1,0101	1,0150	1,0097	0,9863
A_f	1,0154	1,0148	1,0144	1,0161	1,0154	1,0131	1,0168	1,0294
SSE	0,2183	0,0892	0,2395	0,1226	0,2525	0,0776	0,2756	0,3317
R^2	0,9762	0,9969	0,9739	0,9957	0,9725	0,9973	0,9700	0,9883
RMSE	0,1477	0,0945	0,1547	0,1107	0,1589	0,0881	0,1660	0,1821

Los modelos, Bifásico lineal y Gompertz modificado presentan SSE notablemente mejor que los modelos Whiting–Buchanan y Baranyi, en el tratamiento térmico combinado con ultrasonido. En cambio, en los datos de tratamiento sin ultrasonido (50 °C), los resultados no presentan diferencias significativas para el conjunto de datos estimados, en el desempeño todos los modelos, mostrando valores de SSE entre 0,2183 y 0,2756.

El A_f del modelo Baranyi para el tratamiento combinado es significativamente peor con respecto a los otros tres modelos. Mientras que los otros modelos, no difieren significativamente para el conjunto de datos evaluados.

Los índices A_f y B_f evidencian los resultados de tiempo de reducción decimal presentados en la Tabla 2. En los modelos Bifásico lineal y Gompertz modificado los índices muestran que los datos entregados por el modelo sobreestiman, en promedio, los datos observados. En cambio, los modelos Whiting–Buchanan y Baranyi, en promedio subestiman los datos observados. En consecuencia, los modelos Bifásico Lineal y Gompertz modificado generan valores de T_{5-D} mayores que los obtenidos en los modelos Whiting–Buchanan y Baranyi.

Los valores de R^2 para el desempeño de los modelos en los datos de validación son mejores para el caso del tratamiento térmico combinado con ultrasonido que en el tratamiento sólo térmico, debido a la rápida disminución de microorganismos patógenos en este tratamiento, lo que produce que la dispersión de los datos sea mayor con respecto al otro tratamiento, por lo tanto el coeficiente de correlación es mayor, lo que representa una ventaja para el tratamiento combinado propuesto en este estudio.

6. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron datos de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 en jugo de zanahoria sometida a tratamientos de térmicos y tratamiento térmico combinado con energía de ultrasonido, a 40, 50 y 60 °C. Durante ambos tratamientos a 40 °C no hubo efecto de inactivación de la bacteria, en cambio en los otros tratamientos se observaron curvas de inactivación no lineales.

La aplicación de modelos no lineales a curvas de inactivación microbiológicas a partir de tratamientos térmicos y combinados con energía de ultrasonidos permite explicar la cinética de letalidad de *E. coli* ATCC 25922. En la validación de datos experimentales los modelos Bifásico Lineal y Gompertz modificado fueron mejores y más robustos que los modelos Whiting–Buchanan y Baranyi de acuerdo a resultados de SSE y R².

La utilización de los modelos arriba mencionados permiten modelar el comportamiento de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 mediante parámetros cinéticos la letalidad y obtener los tiempos de pasteurización cuando este proceso se apoya con la aplicación de ultrasonido. De acuerdo al desempeño de los cuatro modelos no lineales evaluados, fue posible modelar el comportamiento no lineal de *E. coli* ATCC 25922 durante la inactivación microbiológica y obtener los valores de T_{5-D} en curvas con; fase de latencia, curvas con sección de cola y curvas de tipo sigmoidea.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Albornoz, P. 2014. Uso de ultrasonido en el proceso de pasteurización de jugo de zanahoria (*Daucus carota*) var. Elegans. Tesis de grado, Ing. Agroindustrial. Universidad de Concepción, Campus Chillán, Chile.
2. Arthey, D., C. Dennis. 1992. Procesado de hortalizas. Acribia. Zaragoza, España.
3. Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277–294.
4. Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10, 43–59.
5. Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., Phillips, J.G., Smith, J.L., 1994. Non-thermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 59, 179–188.
6. Cerf, O., 1977. A REVIEW Tailing of survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 1–19.
7. Cheng, L.H., Soh, C.Y., Liew, S.C., Teh, F.F., 2007. Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chem.* 104, 1396–1401.
8. Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2005. Microbial inactivation by ultrasound, in: Barbosa-Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (Eds.), *Novel Food Processing Techniques*. CRC Press, Boca Raton, USA., pp. 423–430.
9. Degirmenci, H., Karapinar, M., Karabiyikli, S., 2012. The survival of *E. coli* O157: H7, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* in black carrot (*Daucus carota*) juice. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 212–5.
10. Feng, H., Yang, W., 2006. Power ultrasound, in: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. CRC Press, Boca Raton, USA., pp. 121–1–121–9.

11. Fujikawa, H., Itoh, T., 1996. Tailing of thermal inactivation curve of *Aspergillus niger* spores. These include : Tailing of Thermal Inactivation Curve of *Aspergillus niger* spores. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3745–3749.
12. Gil, M.M., Brandao, T.R.S., Silva, C.L.M., 2006. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. J. Food Eng. 76, 89–94.
13. Gonçalves, E.M., Pinheiro, J., Abreu, M., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., 2010. Carrot (*Daucus carota* L.) peroxidase inactivation, phenolic content and physical changes kinetics due to blanching. J. Food Eng. 97, 574–581.
14. Hancock, R.D., Stewart, D., 2010. Enhancing the nutritional quality of fruit juices: advanced technologies for juice extraction and pasteurization, in: Bagchi, D., Ghosh, F.C., Lau, D.K. (Eds.), Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 465–484.
15. Humpheson, L., Adams, M.R., Anderson, W.A., Cole, M.B., 1998. Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. Appl. Environ. Microbiol. 64, 459–464.
16. Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., Martin, S.E., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. J. Food Eng. 93, 354–364.
17. Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., Hackney, C.R., 1995. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Prot. 58, 946–954.
18. Ma, T., Tian, C., Luo, J., Zhou, R., Sun, X., Ma, J., 2013. Influence of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice. Food Chem. 141, 1637–44.

19. Mason, T., Paniwnyk, L., Lorimer, J., 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* 3, S253–S260.
20. Peleg, M., Cole, M.B., 2010. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 353–380.
21. Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R., 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 207–216.
22. Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 501–508.
23. Singh, R.P., Heldman, D.R., 1997. *Introducción a la ingeniería de alimentos.* Edit. Acribias, Zaragoza, España.
24. Swanson, K.M., Petran, R.L., Hanlin, J.H., 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms, in: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* American Public Health Association, Washington D.C., USA., pp. 53–62.
25. Torregrosa, F., Esteve, M.J., Frígola, A., Cortés, C., 2006. Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange–carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. *J. Food Eng.* 73, 339–345.
26. Ugarte-Romero, E., Feng, H., Martin, S.E., Cadwallader, K.R., Robinson, S.J., 2006. Inactivation of *Escherichia coli* with power ultrasound in apple cider. *J. Food Sci.* 71, E102–E108.
27. US Food and Drug Administration, 2004. *Guidance for industry: Juice HACCP hazards and controls guidance first edition; final guidance.*
28. Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., Lizama, V., 2007. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *J. Food Eng.* 80, 509–516.

29. Whiting, R., Sackitey, S., Calderone, S., Morely, K., Phillips, J., 1996. Model for the survival of *Staphilococcus aureus* in nongrowth environments. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 231–243.
30. Whiting, R.C., 1993. Modelling bacterial survival in unfavorable environments. *J. Ind. Microbiol.* 12, 240–246.
31. Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A., Linton, R.H., Sheard, M.A., 1999a. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiol.* 16, 269–279.
32. Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A.E., Sheard, M.A., 1999b. A mathematical model for bacterial inactivation. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 45–55.
33. Zenker, M., Heinz, V., Knorr, D., 2003. Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. *J. Food Prot.* 66, 1642–1649.
34. Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

APÉNDICE 1: Metodología de adquisición de datos experimentales

1.1 Preparación del cultivo para estudios de inactivación

Se utilizó como microorganismo indicador en este estudio *E. coli* ATCC 25922, obtenida de la Colección de Docencia del Laboratorio de Microbiología y Micología Aplicada de la Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción. Esta bacteria fue cultivada en caldo soya triptica (Merck), a 35 °C por 24 horas en estufa de cultivo. Basado en ensayos preliminares se inoculó 1 ml en 400 ml de jugo de zanahoria (pH 6,52 y 9,23 °Brix) y se dejó por 5 h a 40 °C para obtener que las células estuvieran al final de la fase logarítmica de crecimiento y al comienzo de la fase estacionaria. La concentración de células antes de aplicar los tratamientos fue 10⁸ UFC/ml de jugo de zanahoria.

1.2 Tratamiento térmico y tratamiento combinado con ultrasonidos

El tratamiento termal fue realizado en un Baño Termostatado, modelo DK4-8AX, de 50 kHz de frecuencia y 600 W de potencia. El tratamiento termal combinado con ultrasonidos fue realizado en un Baño con ultrasonido, marca Branson, modelo 2510, de 40 kHz de frecuencia y 100 W de potencia nominal. Las muestras de jugo inoculadas fueron envasadas en frascos de vidrio de 30 ml, el tiempo de exposición a cada tratamiento fueron 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 minutos; a temperaturas de 40, 50 y 60 °C, respectivamente. En cada uno de los ensayos las mediciones se hicieron por triplicado. Inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos las muestras fueron transferidas a un baño con agua fría y usadas para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

1.3 Recuento de células post-tratamiento

El recuento de microorganismos se hizo realizando diluciones seriadas de la muestra en agua peptonada (0,1 %) y se utilizó la técnica siembra en fondo por vertido en placas de conteo (Swanson et al., 2001), se usó el medio de cultivo EMB Levine (Merck), medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de enterobacterias, aislamiento e identificación de *E. coli*. Finalmente, las placas fueron incubadas a 45 °C por 48 h previo al recuento de colonias utilizando un contador de colonias, marca Bantex, modelo 920A. El recuento obtenido se multiplicó por el inverso de la dilución utilizada, resultando la concentración de células presentes, expresado en UFC/mL.

APÉNDICE 2: Datos experimentales

Tabla A-1: Datos de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (40 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (40 °C 40 kHz), (UFC/ml).

Tiempo (min)	40 °C			40 °C 40 kHz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	85.000.000	61.000.000	194.400.000	85.000.000	61.000.000	194.000.000
3	104.000.000	93.000.000	149.000.000	95.000.000	63.300.000	87.000.000
6	137.000.000	91.900.000	159.000.000	100.000.000	64.400.000	51.000.000
9	154.000.000	101.000.000	102.000.000	107.000.000	69.000.000	69.000.000
12	168.000.000	107.000.000	114.400.000	30.000.000	71.000.000	115.000.000
15	187.000.000	114.000.000	99.600.000	170.000.000	91.000.000	104.000.000
18	207.000.000	115.000.000	78.000.000	257.000.000	123.000.000	109.000.000
21	255.000.000	121.000.000	76.000.000	49.000.000	134.000.000	110.000.000
24	224.000.000	130.000.000	95.000.000	221.000.000	168.000.000	113.000.000
27	228.000.000	160.000.000	90.000.000	26.000.000	170.000.000	155.000.000
30	234.000.000	264.000.000	70.000.000	50.000.000	178.000.000	176.000.000

R1, R2 y R3 son repeticiones para cada tratamiento.

Representación gráfica de $\text{Log}(N/N_0)$ promedio para datos mostrados en la Tabla A-1:

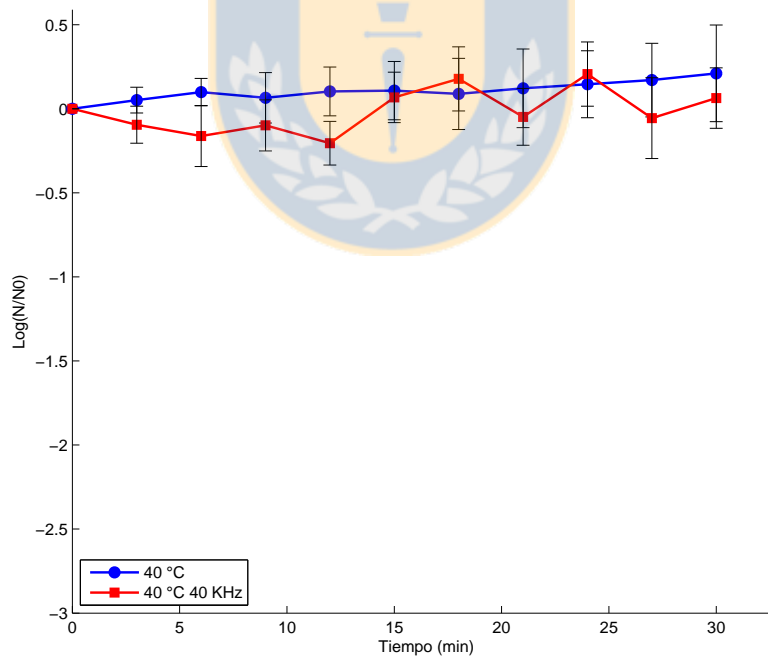


Figura A-1: Curvas de inactivación para *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (40 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (40 °C 40 kHz)

Tabla A-2: Datos de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (50 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (50 °C 40 kHz), (UFC/ml).

Tiempo (min)	50 °C			50 °C 40 kHz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	114.000.000	115.000.000	79.000.000	114.000.000	115.000.000	79.000.000
3	130.000.000	113.000.000	62.000.000	104.000.000	173.000.000	107.000.000
6	151.000.000	94.000.000	61.000.000	60.000.000	99.000.000	96.000.000
9	82.500.000	83.000.000	53.000.000	18.000.000	7.000.000	9.200.000
12	112.000.000	44.000.000	48.000.000	600.000	1.000.000	600.000
15	120.000.000	32.000.000	37.000.000	94.000	220.000	63.000
18	62.500.000	7.560.000	34.000.000	80.000	30.000	43.000
21	15.390.000	2.640.000	24.600.000	30.000	26.000	24.000
24	4.500.000	1.520.000	4.200.000	15.000	26.500	14.000
27	1.085.000	530.000	880.000	24.000	21.100	11.300
30	165.600	138.000	590.000	10.300	12.700	9.000

R1, R2 y R3 son repeticiones para cada tratamiento.

Representación gráfica de $\text{Log}(N/N_0)$ promedio para datos mostrados en la Tabla A-2:

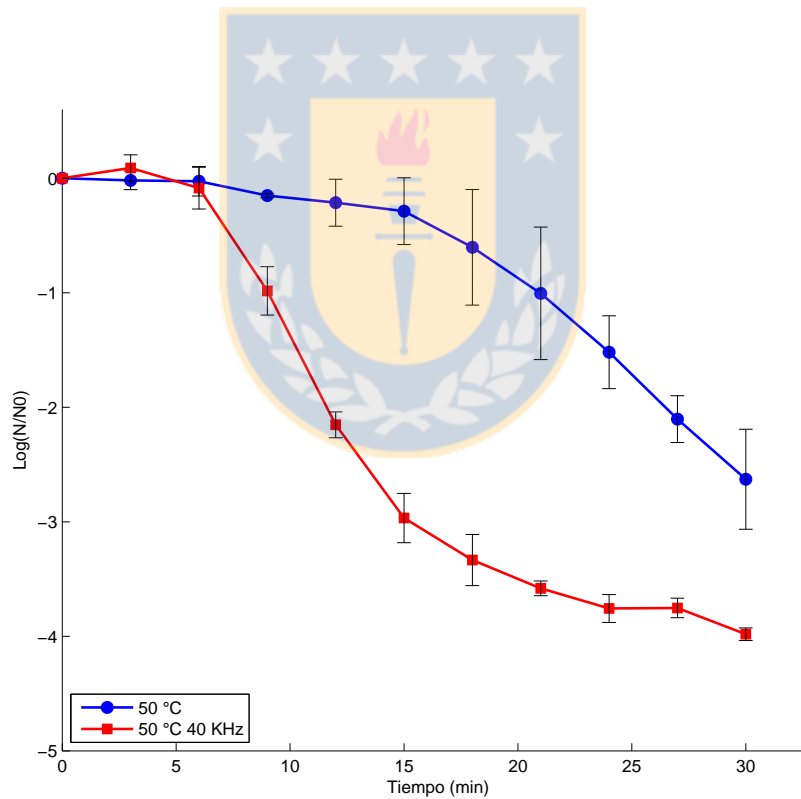


Figura A-2: Curvas de inactivación para *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (50 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (50 °C 40 kHz)

Tabla A-3: Datos de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (60 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (60 °C 40 kHz), (UFC/ml).

Tiempo (min)	60 °C			60 °C 40 kHz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	116.000.000	142.000.000	137.000.000	116.000.000	142.000.000	137.000.000
3	80.000.000	84.700.000	70.000.000	50.400.000	44.900.000	45.000.000
6	50.400.000	51.000.000	5.800.000	189.000	110.000	250.000
9	14.400.000	1.900.000	1.300.000	28.500	22.400	132.000
12	992.000	110.000	342.000	1.560	1.030	1.230
15	32.000	14.400	24.500	680	800	500
18	1.600	1.400	1.210	433	258	190
21	600	400	435	192	76	120
24	281	230	191	80	31	57
27	124	117	110	63	26	53
30	105	106	97	60	23	47

R1, R2 y R3 son repeticiones para cada tratamiento.

Representación gráfica de $\text{Log}(N/N_0)$ promedio para datos mostrados en la Tabla A-3:

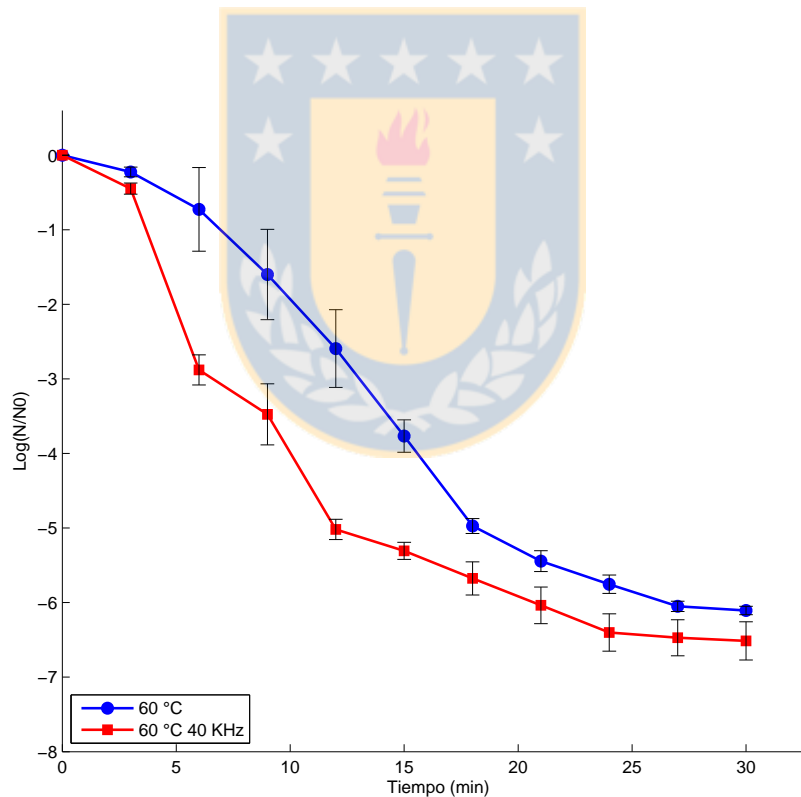


Figura A-3: Curvas de inactivación para *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (60 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (60 °C 40 kHz)

APÉNDICE 3: Datos experimentales para validación de modelos

Tabla A-4: Datos de inactivación de *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (50 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (50 °C 40 kHz), (UFC/ml).

Tiempo (min)	50 °C			50 °C 40 kHz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	114.000.000	115.000.000	79.000.000	114.000.000	115000.000	79.000.000
3	130.000.000	130.000.000	62.000.000	134.000.000	173.000.000	107.000.000
6	151.000.000	64.000.000	61.000.000	60.000.000	99.000.000	96.000.000
9	82.500.000	83.000.000	53.000.000	18.000.000	7.000.000	9.200.000
12	112.000.000	44.000.000	48.000.000	600.000	1.000.000	600.000
15	120.000.000	72.000.000	37.000.000	94.000	220.000	30.000
18	62.500.000	7.560.000	34.000.000	80.000	30.000	43.000
21	5.390.000	5.640.000	4.600.000	30.000	26.000	14.000
24	4.500.000	1.520.000	4.200.000	15.000	26.500	4.000
27	185.000	530.000	880.000	24.000	21.100	11.300
30	165.600	138.000	590.000	10.300	12.700	9.000

R1, R2 y R3 son repeticiones para cada tratamiento.

Representación gráfica de $\text{Log}(N/N_0)$ promedio para datos mostrados en la Tabla A-4:

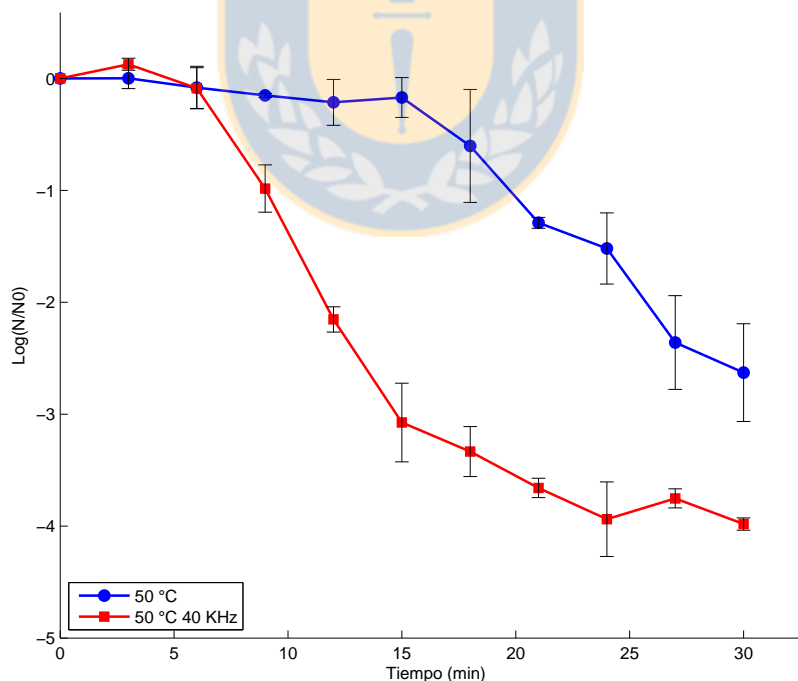


Figura A-4: Curvas de inactivación para *E. coli* ATCC 25922 inoculada en jugo de zanahoria tratado con tratamiento térmico (50 °C) y tratamiento térmico combinado con ultrasonidos (50 °C 40 kHz)

APÉNDICE 4: Desarrollo matemático de los modelos no lineales utilizados

Modelo Bifásico Lineal y Whiting-Buchanan

La metodología de desarrollo de estos modelos se obtuvo a partir de los resultados publicado por Xiong et al. (1999a), quienes comparan los parámetros de ambos modelos y además, el parámetro de inactivación microbiológica, T_{4-D} .

Modelo Bifásico lineal (Xiong et al., 1999):

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \begin{cases} 0 & t \leq t_{lag} \\ \log(fe^{-k_1(t-t_{lag})} + (1-f)e^{-k_2(t-t_{lag})}) & t \geq t_{lag} \end{cases} \quad (\text{A-1})$$

Modelo Whiting-Buchanan (Whiting et al., 1993)

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log \left(\frac{f(1 + e^{-b_1 t_{lag}})}{1 + e^{b_1(t-t_{lag})}} + \frac{(1-f)e^{-b_2 t_{lag}}}{1 + e^{b_2(t-t_{lag})}} \right) \quad (\text{A-2})$$

Se generaron datos y construyeron curvas de inactivación a partir de los parámetros publicados por Xiong et al. (1999a) (Tabla 2 y Tabla 3). Luego, sobre estos datos, se implementaron varias alternativas de metodologías que permitieran verificar los resultados obtenidos por los autores. En particular, se eligió los conjuntos de parámetro ubicados en el registro 1 (DS1) y registro 16 (DS2) (Tabla A-5 y A-6).

El criterio para escoger la metodología de trabajo fue aquella donde hubo coincidencia entre el valor obtenido y el valor publicado, tanto en los parámetros del modelos como en el valor de T_{4-D} . Posteriormente se aplicó la metodología escogida a los datos experimentales de este estudio.

Tabla A-5: Parámetros estimados por Xiong et al. (1999) utilizando el modelo Bifásico lineal en datos de inactivación microbiológica.

Registro	k_1 (log UFC/ml/h)	k_2 (log UFC/ml/h)	t_{lag} (h)	$1-f$	R^2	RMSE	t_{4-D} (h)
DS1	0,27256	0,02276	41,156	0,0000446	0,983	0,370	75,78
DS16	0,29266	0,00906	0,00	2,14E-07	1,000	0,000	31,48

Tabla A-6: Parámetros estimados por Xiong et al. (1999) utilizando el modelo Whiting - Buchanan en datos de inactivación microbiológica.

Registro	b_1 (log UFC/ml/h)	b_2 (log UFC/ml/h)	t_{lag} (h)	$1-f$	R^2	RMSE	t_{4-D} (h)
DS1	0,27866	0,02336	41,926	3,55E-05	0,983	0,369	75,58
DS16	0,32156	0,02546	0,00	1,18E-06	1,000	0,000	30,80

De acuerdo a la metodología escogida se determinaron los parámetros t_{lag} , f y $1-f$ de la siguiente manera:

Tiempo de latencia (t_{lag})

La estimación preliminar del parámetro t_{lag} se realizó empleando el siguiente criterio: las curvas que presenten fase de latencia serán aquellas que muestren en la sección inicial crecimiento o inactivación de la población menor al 3% con respecto al inóculo inicial de organismos (N_0). El tiempo de latencia, t_{lag} , será el máximo tiempo donde se verifique el criterio anterior.

Subpoblaciones f y $1-f$

La estimación de las subpoblaciones presentes en las curvas de inactivación (ver en Materiales y métodos Modelo Bifásico lineal) se realizó mediante el ajuste lineal por tramos, a través de dos trazos rectos sobre los datos de inactivación medidos y variando el punto de acoplamiento entre el trazo que termina con el siguiente. El mejor ajuste se determinó cuando hubo el menor error cuadrático acumulado mediante la técnica de mínimos cuadrados a cada subpoblación (Fig. A-5 y A-6)

En el modelo Bifásico lineal, el parámetro f se estimó a partir de la intersección de las 2 rectas obtenidas anteriormente, luego se evaluó el intercepto en una de las rectas obteniendo la concentración de células N_1 (Log UFC/ml) al final de la subpoblación 1 y comienzo de la subpoblación 2.

En el modelo Whiting-Buchanan, el parámetro f se estimó a partir de la tendencia de la recta de la subpoblación 2, por ello si la curva poseía t_{lag} , esta recta se evaluó en $t = t_{lag}$, en el caso que la curva no poseía t_{lag} , la recta se evaluó en $t = 0$, para obtener N_1 .

Luego, para ambos modelos, f se determinó de la siguiente manera:

$$f = \frac{10^{N_0} - 10^{N_1}}{10^{N_0}} \quad (\text{A-3})$$

Posteriormente, los parámetros t_{lag} , k_1 , k_2 y t_{lag} , b_1 , b_2 , se obtuvieron mediante el ajuste de los datos observados a los modelos mencionados, respectivamente, utilizando la herramienta *curve fitting* de Matlab®.

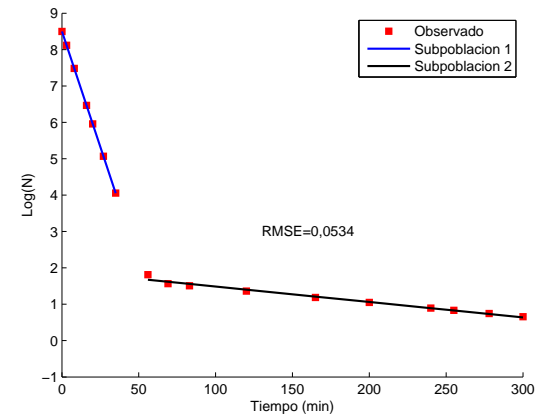
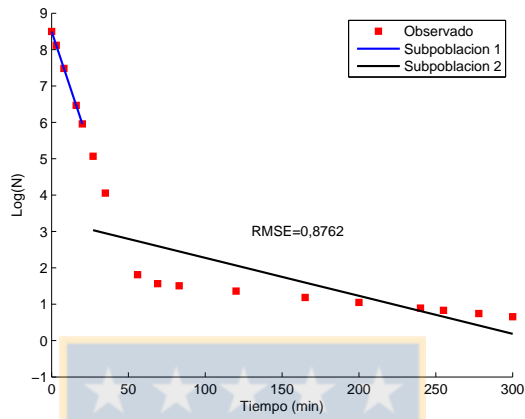
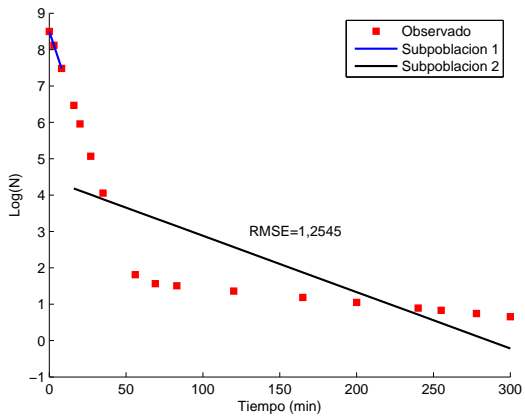


Figure A-5: Identificación de subpoblaciones de acuerdo a DS16

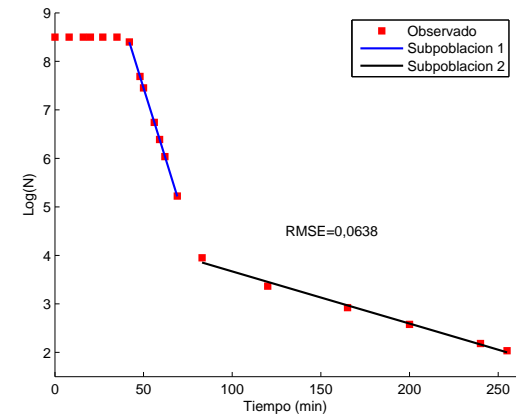
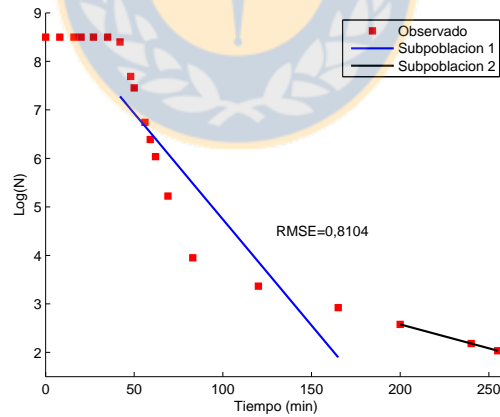
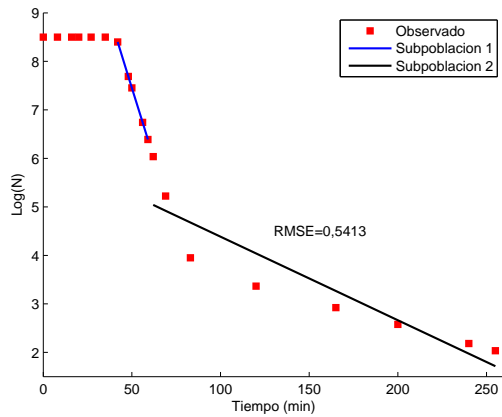


Figure A-6: Identificación de subpoblaciones de acuerdo a DS1

Modelo Gompertz modificado

Este modelo de inactivación microbiológica es representado por la siguiente ecuación:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = Ce^{-e^{BM}} - Ce^{-e^{-B(t-M)}} \quad (\text{A-4})$$

Donde B y C son constantes obtenidas por el ajuste dado por el modelo. A partir de estos valores es posible obtener los parámetros μ_{max} y t_{lag} .

$$\mu_{max} = \frac{BC}{e} \quad (\text{A-5})$$

$$t_{lag} = M - \frac{1}{B} + \frac{\log N_0 - A}{\frac{BC}{e}} \quad (\text{A-6})$$

Modelo Baranyi (Baranyi et al., 1993)

Modelo que describe la inactivación de microorganismos, el cual permite evaluar curvas no lineales, con sección de hombros y sección de cola. Este modelo se desarrolló de acuerdo al siguiente P.V.I.:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN}{dt} = -\mu_{max}\alpha(t)\beta(t)N \quad (N > 0; t \geq 0) \\ N(0) = N_0 \quad N_0 > 0; t = 0 \end{array} \right. \quad (\text{A-7})$$

Xiong et al. (1999b) proponen las funciones $\alpha(t)$ y $\beta(t)$ para describir la sección de hombros y colas en curvas de inactivación, respectivamente.

El parámetro n toma valores enteros positivos ($n = 1, 2, \dots, 6$) y el parámetro r es el tiempo requerido para que la velocidad de muerte relativa alcance la mitad de μ_{max} .

$$\alpha(t) = 1 - \frac{r^n}{r^n + t^n} \quad (\text{A-8})$$

$$\beta(t) = 1 - \frac{N_{min}}{N} \quad (\text{A-9})$$

Donde N_{min} representa la mínima concentración de células remanentes en la fase de cola.

Reemplazando la Ec.(A-8) y Ec.(A-9) en (A-7) es posible resolver el P.V.I de forma directa, con el método de separación de variables, a través del siguiente procedimiento:

$$\frac{dN}{dt} = -\mu_{max}\alpha(t)(N - N_{min})$$

$$\frac{dN}{(N - N_{min})dt} = -\mu_{max}\alpha(t)$$

Luego, integrando en ambos lados de la ecuación, se obtiene:

$$\ln\left(\frac{N(t) - N_{min}}{N_0 - N_{min}}\right) = -\mu_{max} \int_0^t \left(1 - \frac{r^n}{r^n + t^n}\right) \cdot dt$$

y

$$\frac{N(t) - N_{min}}{N_0 - N_{min}} = e^{-\mu_{max}(t-B(t))}$$

Finalmente,

$$N(t) = N_{min} + (N_0 - N_{min})e^{-\mu_{max}(t-B(t))}$$

Donde,

$$B(t) = \int_0^t \frac{r^n}{r^n + s^n} \cdot ds \tag{A-10}$$

es la función que describe la curvatura en la fase de latencia.

Posteriormente, dividiendo en ambos lados por N_0 permite obtener las siguientes expresiones:

$$\frac{N(t)}{N_0} = \frac{N_{min}}{N_0} + \left(1 - \frac{N_{min}}{N_0}\right) e^{-\mu_{max}(t-B(t))}$$

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log \left(\frac{N_{min}}{N_0} + \left(1 - \frac{N_{min}}{N_0}\right) e^{-\mu_{max}(t-B(t))} \right)$$

El término q_B se define como $q_B = (N_{min}/N_0)$ y describe el segmento de cola, cuando $q_B = 0$ significa que no hay fase de cola. Luego, sustituyendo q_B en la expresión anterior se obtiene el modelo de Baranyi para curvas de inactivación, Ec.(A-11):

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log(q_B + (1 - q_B)e^{-\mu_{max}(t-B(t))}) \quad (\text{A-11})$$

Por otro lado, la expresión $B(t)$ (Ec. A-10) también se puede escribir como:

$$B(t) = \int_0^t \frac{1}{1 + \frac{s^n}{r^n}} \cdot ds$$

Luego, haciendo la sustitución $x = s^n/r^n$ en la integral anterior se obtiene una nueva expresión para $B(t)$:

$$B(t) = r \int_0^{t/r} \frac{1}{1 + x^n} \cdot dx$$

Para lograr una expresión explícita de $B(t)$ se utilizó una tabla de integrales indefinidas, obteniéndose las siguientes expresiones:

Si n es par:

$$\int \frac{dx}{1 + x^{2k}} = -\frac{1}{2k} \sum_{v=0}^{k-1} \ln \left(x^2 - 2x \cos \frac{2v+1}{2k} \pi + 1 \right) \cos \frac{2v+1}{2k} \pi$$

$$+ \frac{1}{k} \sum_{v=0}^{k-1} \arctan \left(\frac{x \sin \frac{2v+1}{2k+1} \pi}{1 - \cos \frac{2v+1}{2k+1} \pi} \right) \sin \frac{2v+1}{2k} \pi$$

Si n es impar:

$$\int \frac{dx}{1+x^{2k+1}} = \frac{1}{2k+1} \ln|1+x| \sum_{v=0}^{k-1} \ln \left(x^2 - 2x \cos \frac{2v+1}{2k+1} \pi + 1 \right) \frac{2v+1}{2k} \pi$$

$$+ \frac{1}{k} \sum_{v=0}^{k-1} \arctan \left(\frac{x \sin \frac{2v+1}{2k+1} \pi}{1 - \cos \frac{2v+1}{2k+1} \pi} \right) \sin \frac{2v+1}{2k} \pi$$

Posteriormente se resuelve la integral definida

Por ejemplo, para $n = 2$:

$$\int \frac{dx}{1+x^2} = \arctan(x)$$

$$B(t) = r \arctan \left(\frac{t}{r} \right)$$

Por lo tanto, el modelo Baranyi con $n = 2$ queda expresado de la siguiente forma:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log(q_B + (1 - q_B) e^{-\mu_{max}(t - r \arctan(\frac{t}{r}))}) \quad (\text{A-12})$$

Para $n = 3$:

$$B(t) = r \left[\frac{1}{3} \ln \left(1 + \left(\frac{t}{r} \right) \right) - \frac{1}{3} \left[\frac{1}{2} \ln \left(\left(\frac{t}{r} \right)^2 - \left(\frac{t}{r} \right) + 1 \right) \right] \right]$$

$$+ \frac{2}{3} \left[\frac{\sqrt{3}}{2} \arctan \left(\frac{\frac{\sqrt{3}}{2} \left(\frac{t}{r} \right)}{1 - \left(\frac{t}{r} \right)} \right) \right]$$

Como se observa, al aumentar el valor de n la expresión $B(t)$ resulta más extensa, por lo tanto el modelo de Baranyi resulta más complejo. En este trabajo, se utilizó el modelo de Baranyi con diferentes valores de n y posteriormente se escogió el n que presentó menor error sobre la curva de inactivación evaluada.

APÉNDICE 5: Índices estadísticos

Coeficiente de correlación (R^2)

Índice estadístico que mide el éxito que el ajuste explicado por de la variación de los datos. Se define de la siguiente forma:

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (\text{A-13})$$

Error cuadrático acumulado (SSE)

Índice estadístico que mide la desviación total entre los valores observados y los valores estimados por el ajuste.

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{A-14})$$

Un valor cercano a 0 indica que el modelo tiene un error aleatorio menor, y que el ajuste será más útil para la predicción.

Suma Error Total (SST)

Índice estadístico que mide la desviación total entre los valores observados y la media de los mismos, por lo tanto nos indica cuanta variación existe en la variable dependiente.

$$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (\text{A-15})$$

Coeficiente de correlación corregido (R^2)

El coeficiente de correlación mencionado anteriormente se puede corregir basado en los grados de libertad de los residuales. Estos grados de libertad son definidos como los m valores observados menos el número de coeficientes estimados j .

$$R^2 = 1 - \frac{(m - 1) SSE}{(m - j) SST} \quad (\text{A-16})$$

Error cuadrático medio ($RMSE$)

Este índice muestra las diferencias entre el valor predicho por un modelo y el valor observado. Básicamente, la RMSE representa la desviación estándar de las

diferencias entre los valores predichos y los valores observados de la muestra.

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{m - j}} \quad (A-17)$$



Factor de Ajuste (Bias factor, B_f)

B_f se define de la siguiente forma:

$$B_f = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n \log\left(\frac{X_p}{X_o}\right)}{n}} \quad (\text{A-18})$$

Donde, X_p es el valor estimado por el modelo y X_o es el valor observado experimentalmente. Por lo tanto si existe total coincidencia entre los valores estimados y observados el factor de ajuste resulta 1.

$$\begin{aligned} B_f &= 10^{\sum_{i=1}^n \frac{1}{n} \log\left(\frac{X_p}{X_o}\right)} = 10^{\sum_{i=1}^n \log\left(\frac{X_p}{X_o}\right)^{\frac{1}{n}}} \\ &= 10^{\left[\log\left(\frac{X_p^1}{X_o^1}\right)^{\frac{1}{n}} + \log\left(\frac{X_p^2}{X_o^2}\right)^{\frac{1}{n}} + \dots + \log\left(\frac{X_p^n}{X_o^n}\right)^{\frac{1}{n}} \right]} \end{aligned}$$

Finalmente,

$$B_f = \sqrt[n]{\left(\frac{X_p^1}{X_o^1}\right) \cdot \left(\frac{X_p^2}{X_o^2}\right) \cdot \dots \cdot \left(\frac{X_p^n}{X_o^n}\right)}$$

Luego del desarrollo de la expresión B_f (A-18), se aprecia que podrían obtenerse valores de B_f cercanos a 1, aunque las estimaciones sean malas. Esto ocurre, cuando un conjunto de datos evaluados presenta tanto sobreestimaciones como subestimaciones, y éstas se compensarían cuando son del mismo orden. Por lo tanto, B_f nos indica si los datos entregados por el modelo están, en promedio, sobreestimando o subestimando los datos observados.

Factor de Exactitud (Accuracy factor, A_f)

A_f se define de la siguiente forma:

$$A_f = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n \left| \log\left(\frac{X_p}{X_o}\right) \right|}{n}} \quad (\text{A-19})$$

Si existe coincidencia entre los valores estimados y observados el factor A_f resulta 1.

$$A_f = 10^{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right) \right|} = 10^{\sum_{i=1}^n \left| \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right) \right|^{\frac{1}{n}}}$$

Luego, al analizar el argumento dentro del valor absoluto, existen dos alternativas:

Sí $\frac{X_p^i}{X_o^i} < 1$, entonces

$$\log \frac{X_p^i}{X_o^i} < 0 \Rightarrow \left| \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right) \right| = -\log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right) = \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right)^{-1} = \log\left(\frac{X_o^i}{X_p^i}\right)$$

O bien, sí $\frac{X_p^i}{X_o^i} \geq 1$, entonces

$$\log \frac{X_p^i}{X_o^i} > 0 \Rightarrow \left| \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right) \right| = \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right)$$

Por lo tanto,

$$A_f = 10^{\sum_{i=1}^n \left| \log\left(\frac{X_p^i}{X_o^i}\right) \right|^{\frac{1}{n}}} = 10^{\left[\left| \log\left(\frac{X_p^1}{X_o^1}\right) \right|^{\frac{1}{n}} + \left| \log\left(\frac{X_p^2}{X_o^2}\right) \right|^{\frac{1}{n}} + \dots + \left| \log\left(\frac{X_p^n}{X_o^n}\right) \right|^{\frac{1}{n}} \right]} \geq 1$$

El índice A_f tendrá valor igual a 1 cuando los datos estimados por el modelo coinciden plenamente con los datos observados. En los casos donde se obtengan valores de A_f mayores a 1, esto indicará que los datos estimados difieren en mayor medida a los datos observados.

El uso en conjunto de los índices B_f y A_f nos permite evaluar el desempeño de los modelos en la validación de datos. El índice B_f nos muestra si los datos estimados están, en promedio, subestimados o sobreestimados con respecto a los datos observados; el índice A_f nos indica que tan buena es la estimación de acuerdo al modelo utilizado.