

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“SOFTWARE PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS  
CINÉTICOS DE LA DESTRUCCIÓN DE ESPORAS *Bacillus  
subtilis/amyloliquefaciens* POR UN MÉTODO NO ISOTÉRMICO”**

**Presentada por:**

**JOSÉ PAÚL CASAS VÁSQUEZ**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Lima - Perú**

**2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“SOFTWARE PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS  
CINÉTICOS DE LA DESTRUCCIÓN DE ESPORAS *Bacillus  
subtilis/amyloliquefaciens* POR UN MÉTODO NO ISOTÉRMICO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:  
JOSÉ PAÚL CASAS VÁSQUEZ**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Luis Fernando Vargas Delgado  
**PRESIDENTE**

Dra. Carmen Velezmoro Sánchez  
**PATROCINADORA**

Mg.Sc. Francisco Salas Valerio  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Carlos Elías Peñafiel  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a Dios, a la Virgen María Auxiliadora, y a mi querida familia; por todo su apoyo incondicional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación no se hubiera realizado sin la ayuda y el trabajo de muchas personas, a las quiero agradecer sinceramente por su colaboración y al mismo tiempo dedicar este trabajo.

Deseo destacar especialmente el trabajo realizado por mi patrocinadora de tesis, la Dra. Carmen Velezmoro Sánchez, a quien agradezco por todos los consejos y me haya brindado la oportunidad de compartir sus conocimientos.

A mi jurado de tesis: Ph.D. Fernando Vargas, Mg.Sc. Francisco Salas y Mg.Sc. Carlos Elías por su sincero apoyo y consideración hacia mi persona.

Agradezco al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso”, dirigido exitosamente por la Dra. Doris Zúñiga Dávila, por permitirme utilizar sus equipos e instalaciones.

Mi gratitud y amistad duradera a mis compañeros del Laboratorio Marino Tabusso, Elena, Ricardo, Soledad y David, que aportaron sus ideas y consejos en el desarrollo de la investigación.

Al Ing. Rolando Zapata Maraví por sus enseñanzas en la metodología de programación del Método PEIE.

A mi familia y amigos que colaboraron de manera desinteresada en la culminación de esta tesis, gracias porque sé que lo hicieron con todo cariño.

# INDICE GENERAL

Dedicatoria  
Agradecimiento  
Resumen  
Abstract

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1 Tratamiento térmico	3
2.1.1 Tratamiento térmico en alimentos	3
2.2 Microorganismos de importancia en el tratamiento térmico	4
2.2.1 Características de las esporas bacterianas	6
2.3 Microorganismos en alimentos de media y baja acidez	7
2.3.1 Bacterias esporuladas aerobias	7
2.3.2 Bacterias esporuladas anaerobias	8
2.3.3 Bacterias esporuladas en la cadena productiva del espárrago blanco	9
2.4 Destrucción de microorganismos por calor	10
2.5 Medida de la termorresistencia de microorganismos	11
2.5.1 Adquisición de datos de temperatura	12
2.5.2 Termocuplas	12
2.5.3 Discos TDT ( Thermal Death Time disk)	13
2.5.4 Microorganismos usados como indicadores	14
2.6 Métodos para la determinación de parámetros cinéticos	15
2.6.1 Método Isotérmico	15
2.6.2 Métodos no isotérmicos	17
2.7 Método Paired Equivalent Isothermal Exposure (PEIE)	18
2.8 Espárragos	20

2.8.1 Espárragos en conserva	21
2.8.2 Producción nacional	21
2.8.3 Exportación de espárragos	24
2.9 Programación con <i>Visual Basic.NET</i> 2010	24
2.9.1 Programación Extrema (XP)	25
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1 Lugar de ejecución	27
3.2 Material Biológico	27
3.3 Materiales y Equipos	29
3.4 Metodología	30
3.4.1 Activación de microorganismos	30
3.4.2 Producción de esporas en medio solido	30
3.4.3 Tinción de esporas (Método de Wirtz)	31
3.4.4 Cosecha, purificación y almacenamiento de esporas	31
3.4.5 Recuento de bacterias esporogénicas	32
3.4.6 Destrucción de esporas en discos TDT con registro de la temperatura	33
3.4.7 Procesos térmicos para el desarrollo del método PEIE a temperaturas menores a 100°C	35
3.4.8 Procesos térmicos para el desarrollo del método PEIE a temperaturas superiores a 100°C	35
3.4.9 Preparación de las muestras para el tratamiento térmico	36
3.4.10 Determinación de parámetros cinéticos	37
3.5 Desarrollo del método PEIE en base a los datos experimentales	38
3.5.1 Desarrollo del <i>Software KineticLab</i>	41
3.5.2 <i>Software KineticLab</i>	42
3.5.3 Interacción <i>software KineticLab</i> - usuario	44
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
4.1 Recuento de bacterias esporogénicas y porcentaje de esporulación	45

4.2 Desarrollo del método PEIE y el software <i>KineticLab</i>	47
4.2.1 <i>KineticLab</i> utilizando temperaturas inferiores a 100 °C	48
4.2.2 <i>KineticLab</i> utilizando temperaturas superiores a 100 °C	58
<b>V. CONCLUSIONES</b>	69
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	70
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	71
<b>VIII. ANEXOS</b>	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Deterioro microbiológico en función de la acidez del producto	5
<b>Tabla 2.</b> Factores que influyen en la termorresistencia de las esporas	6
<b>Tabla 3.</b> Valores de $D$ y $z$ para diferentes microorganismos	14
<b>Tabla 4.</b> Identificación de <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	27
<b>Tabla 5.</b> Procesos térmicos (Temperaturas inferiores a 100 °C)	35
<b>Tabla 6.</b> Procesos térmicos (Temperaturas superiores a 100 °C)	35
<b>Tabla 7.</b> Determinación del valor G	39
<b>Tabla 8.</b> Método PEIE: Pares de Exposiciones Isotérmicas Equivalentes por iteración	40
<b>Tabla 9.</b> Recuento de células esporogénicas y porcentaje de esporulación.	46
<b>Tabla 10.</b> Tiempo de llegada a la temperatura de trabajo (inferiores a 100 °C) del puré de espárragos, cuando el medio calefactor fue agua destilada.	50
<b>Tabla 11.</b> Datos experimentales de resistencia térmica de las esporas de <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i> (Temperaturas inferiores a 100°C)	51
<b>Tabla 12.</b> Primera iteración (temperaturas inferiores a 100°C)	53
<b>Tabla 13.</b> Segunda iteración	53
<b>Tabla 14.</b> Tercera iteración	53
<b>Tabla 15.</b> Determinación de valores $D_e$ método PEIE	57
<b>Tabla 16.</b> Tiempos de llegada a la temperatura de trabajo (superior a 100°C) del puré de espárragos, cuando el medio calefactor fue fluido térmico.	59
<b>Tabla 17.</b> Procesos térmicos de 100, 110 y 120°C con esporas de <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> y conservas de espárragos.	60
<b>Tabla 18.</b> Primera iteración (temperaturas superiores a 100°C)	63
<b>Tabla 19.</b> Segunda iteración (temperaturas superiores a 100°C)	63
<b>Tabla 20.</b> Tercera iteración (temperaturas superiores a 100°C)	63
<b>Tabla 21.</b> Cuarta iteración (temperaturas superiores a 100°C)	64
<b>Tabla 22.</b> Quinta iteración (temperaturas superiores a 100°C)	64
<b>Tabla 23.</b> Sexta iteración (temperaturas superiores a 100°C)	64
<b>Tabla 24.</b> Valores $D_e$ método PEIE (Temperaturas superiores a 100°C)	66
<b>Tabla 25.</b> Comparación de resultados entre el Software <i>KineticLab</i> y <i>Excel</i>	68



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Sistema de medida con termocuplas	12
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los discos TDT	13
<b>Figura 3.</b> Turiones de espárragos	20
<b>Figura 4.</b> Conservas de espárragos	21
<b>Figura 5.</b> Zonas de producción de espárrago en el Perú	22
<b>Figura 6.</b> Flujo de elaboración de conservas de espárragos blancos	23
<b>Figura 7.</b> Exportaciones de espárragos por tipo (millones de dólares)	24
<b>Figura 8.</b> <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	28
<b>Figura 9.</b> Espárragos blancos en conserva	28
<b>Figura 10.</b> Producción de esporas	30
<b>Figura 11.</b> Tinción de esporas <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	31
<b>Figura 12.</b> Preparación del inóculo (Suspensión de esporas en agua estéril)	33
<b>Figura 13.</b> Suspensión de esporas en agua estéril	33
<b>Figura 14.</b> Equipos utilizados en el registro de la historia térmica	34
<b>Figura 15.</b> Registro de la temperatura mediante el software LabVIEW	34
<b>Figura 16.</b> Preparación de muestras de conservas de espárragos	36
<b>Figura 17.</b> Destrucción de esporas por tratamiento térmico en baño térmico a diferentes temperaturas	37
<b>Figura 18.</b> Ejemplo de gráficas de Arrhenius, método PEIE (Welt et al., 1997a)	41
<b>Figura 19.</b> Esquema general para el desarrollo del software	41
<b>Figura 20.</b> Diagrama de funciones, sub-rutinas y módulos del programa <i>KineticLab</i>	43
<b>Figura 21.</b> Carga de datos (temperatura) en el programa <i>KineticLab</i>	44
<b>Figura 22.</b> Izq. suspensión de esporas sin tratamiento térmico. Der. suspensión de esporas con tratamiento térmico	47
<b>Figura 23.</b> Historias térmicas (temperaturas inferiores a 100 °C)	49
<b>Figura 24.</b> Resistencia térmica de las esporas de <i>Bacillus subtilis / amyloliquefaciens</i> a temperaturas menores de 100 °C	51
<b>Figura 25.</b> Representación de los tres procesos isotérmicos equivalentes de la primera iteración del método PEIE	54

<b>Figura 26a.</b>	Presentación de resultados: Regresión Lineal KineticLab	55
<b>Figura 26b.</b>	Gráfica de Arrhenius, con datos de la última iteración.	55
<b>Figura 27.</b>	Determinación de valores $D_e$ (min) método PEIE	56
<b>Figura 28.</b>	Progreso de iteraciones, <i>software KineticLab</i>	58
<b>Figura 29.</b>	Historias térmicas (temperaturas superiores a 100 °C)	59
<b>Figura 30.</b>	Resistencia térmica de esporas de <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> en tres procesos térmicos (temperaturas superiores a 100 °C) utilizando conservas de espárragos.	60
<b>Figura 31.</b>	Representación de los tres procesos isotérmicos equivalentes de la primera iteración del método PEIE (Temperaturas mayores a 100°C).	62
<b>Figura 32.</b>	Gráfica de Arrhenius, método PEIE para temperaturas superiores a 100°C	65
<b>Figura 33.</b>	Determinación de valores $D$	66
<b>Figura 34.</b>	Progreso de iteraciones (temperaturas superiores a 100°C)	67

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO I.</b> MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL ANALISIS	78
<b>ANEXO II.</b> MEDIDA DE LA TEMPERATURA (°C) SEGÚN EL TIEMPO (SEGUNDOS)	79
<b>ANEXO III.</b> HOJAS DE REPORTE <i>Software KineticLab</i>	84
<b>ANEXO IV.</b> DIAGRAMA DE FLUJO <i>Software KineticLab</i>	90
<b>ANEXO V.</b> DIAGRAMAS DE FLUJO Método de Simpson e iteraciones de los pares de procesos	91
<b>ANEXO VI.</b> LISTADO DEL <i>Software KineticLab</i>	92
Manual del usuario	99

# SOFTWARE PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA DESTRUCCIÓN DE ESPORAS *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* POR UN MÉTODO NO ISOTÉRMICO

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo el diseño de un *software* con base en el método PEIE (*Paired Equivalent Isothermal Exposure*), un modelo matemático utilizado para determinar parámetros cinéticos de la destrucción de esporas bacterianas; *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, en modo no isotérmico. Para las pruebas de termorresistencia se emplearon discos de aluminio TDT (*Thermal Death Time*). En cada disco TDT se colocó 1.00 mL de muestra inoculada, aproximadamente 0.9 mL de puré de conservas de espárragos blancos (pH = 4.9) y 0.1 mL de esporas en suspensión. Tanto la concentración inicial y final de microorganismos como los perfiles de temperatura son datos de entrada para el funcionamiento del software, desarrollado en lenguaje *Visual Basic*. Los parámetros cinéticos de destrucción térmica del *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* encontrados con el *software KineticLab* a temperaturas inferiores a 100°C fueron:  $E_a = 180.454 \pm 4.68$  kJ/mol, valores  $D$  ( $D_{85^\circ C} = 16.85 \text{ min} \pm 0.67$ ,  $D_{90^\circ C} = 7.39 \text{ min} \pm 0.24$  y  $D_{95^\circ C} = 3.24 \text{ min} \pm 0.12$ ) y para temperaturas superiores a 100°C fueron:  $E_a = 218.068 \pm 5.61$  kJ/mol, valores  $D$  ( $D_{100^\circ C} = 1.38 \text{ min} \pm 0.23$ ,  $D_{110^\circ C} = 0.22 \text{ min} \pm 0.03$  y  $D_{120^\circ C} = 0.037 \text{ min} \pm 0.01$ ).

**Palabras claves:** Software, parámetros cinéticos, *Bacillus*, espárragos.

# SOFTWARE TO DETERMINE THE KINETIC PARAMETERS OF THE *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* SPORES DESTRUCTION USING A NON-ISOTHERMAL METHOD

## ABSTRACT

The objective of this research was to develop a software based on the PEIE method (Paired Equivalent Isothermal Exposure) which is a non-isothermal mathematical model to determine kinetic parameters for the destruction of bacterial spores: *Bacillus subtilis* / *amyloliquefaciens*. Aluminum TDT (Thermal Death Time) disks were used for thermal resistance tests. In each TDT disk was placed 1.00 mL of inoculated sample, about 0.9 mL of canned white asparagus puree (pH = 4.9) and 0.1 mL of spores in suspension. Both the initial and final concentration of microorganisms and the temperature profiles were input for the software operation which was developed in Visual Basic language. Kinetic parameters of the *Bacillus subtilis/ amyloliquefaciens* thermal destruction obtained by *KineticLab* software at temperatures below 100°C were  $E_a = 180.454 \pm 4.68$  kJ/mol, and  $D$  value ( $D_{85^\circ C} = 16.85$  min  $\pm$  0.67,  $D_{90^\circ C} = 7.39$  min  $\pm$  0.24 y  $D_{95^\circ C} = 3.24$  min  $\pm$  0.12) and at temperatures over 100°C were:  $E_a = 218.068 \pm 5.61$  kJ/mol, and values  $D$  ( $D_{100^\circ C} = 1.38$  min  $\pm$  0.23,  $D_{110^\circ C} = 0.22$  min  $\pm$  0.03 y  $D_{120^\circ C} = 0.037$  min  $\pm$  0.01).

**Keywords:** Software, kinetic parameters, *Bacillus*, asparagus.

## I. INTRODUCCIÓN

Existe una elevada preocupación de los consumidores respecto a la inocuidad de los alimentos, así como un incremento en las exigencias de calidad de los mismos (Klein y Lurie, 1991). En tal sentido, uno de los procedimientos más utilizados para la conservación de alimentos es el tratamiento térmico, que garantiza la inactivación y/o eliminación de los agentes microbianos indeseables, la persistencia de estos agentes depende en gran medida del efecto térmico.

El tratamiento térmico (combinación tiempo – temperatura) requerido para inactivar microorganismos indeseables es de suma importancia, siendo preciso determinar los parámetros de esta operación lo más exactos posibles, para lo cual existen varios modelos matemáticos que permiten estimar estos parámetros en condiciones isotérmicas. En la cinética de destrucción de microorganismos, la transferencia de calor se analiza de dos formas: a temperatura constante (reacciones de primero orden) y a temperatura variable (se toma la temperatura variable en todo el rango de interés, por lo que se logra una mejor aproximación; trabajando con toda la historia térmica de transferencia de calor).

El método iterativo PEIE (*Paired Equivalent Isothermal Exposure*, Welt et al., 1997a) permite desarrollar y encontrar parámetros cinéticos térmicos para este tipo de procesos. Con este método se obtienen resultados de inactividad microbiana con un elevado grado de aproximación. Además, debido a que se sustenta en una secuencia de expresiones matemáticas es posible sistematizarlo mediante un lenguaje de programación y desarrollar un *software* que permite estimar con bastante precisión los siguientes parámetros cinéticos:  $k_0$ ,  $E_a$ ,  $D$  y  $z$ . Los datos de entrada se basan en pruebas experimentales del comportamiento microbiano frente a la temperatura.

Por lo mencionado, es significativo evaluar la cinética térmica de inactivación y/o supervivencia de microorganismos patógenos mediante un método no isotérmico, utilizando como medio de prueba, conservas de espárragos (*Asparagus officinalis*) de la

costa norte del Perú y esporas del género *Bacillus*, debido a que estas son las más termorresistentes de las bacterias.

El objetivo del presente trabajo fue:

- Elaborar un *software* utilizando el método no isotérmico PEIE, determinando los parámetros cinéticos para la destrucción térmica del *Bacillus subtilis* /*amyloliquefaciens*, y su validación con datos reales.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Tratamiento térmico**

Se denomina tratamiento térmico al proceso en el cual algún objeto se somete intencionalmente a una secuencia específica de tiempo-temperatura. Estos procesos pueden provocar transformaciones deseables o indeseables de los constituyentes estructurales. Por ejemplo, la interacción tiempo-temperatura puede inducir el desarrollo de células vivas, cambios de color, sabor y textura en el caso de alimentos, asimismo otra combinación adecuada resultará eficaz para inactivar enzimas y/o bacterias indeseables (Ureña y Elías, 2004). Los tratamientos por calor pueden ser controlados de manera muy exacta tanto en el tiempo, como en la temperatura aplicada al producto.

#### **2.1.1 Tratamiento térmico en alimentos**

Uno de los objetivos primordiales del tratamiento térmico en alimentos es asegurar la destrucción de todos los organismos vivos capaces de deteriorar el producto o de perjudicar la salud del consumidor (Hersom y Hulland, 1995). Sin embargo, también es necesario conservar e incluso mejorar las cualidades organolépticas y nutritivas en cuanto sea posible (Ureña y Elías, 2004). En opinión de Potter y Hotchkiss (1999) el procesamiento térmico no sólo incide sobre los microorganismos presentes en el alimento, sino que afecta la calidad general del mismo. Fennema (1993) menciona que tratamientos térmicos como la esterilización acarrearán la destrucción parcial de restos de cisteína y cistina y la formación de sulfuro de hidrógeno, dimetil sulfuro y ácido cisteico, generando cambios sensoriales en algunos alimentos. En consecuencia, se ha demostrado que el calor modifica las características físico-químicas, microbiológicas, nutricionales y sensoriales de los alimentos. Los principales componentes de estos (proteínas, carbohidratos, grasas y micronutrientes) se ven afectados en su estructura molecular debido a reacciones químicas, de solubilidad y daños mecánicos.

La historia refiere que Nicolas François Appert (1749-1841) investigó y desarrolló las primeras técnicas del tratamiento térmico en alimentos, iniciando así los métodos de conservación hermética por calor (appertización), y la primera fábrica comercial de conservas en el mundo. Más adelante (1860) el químico y bacteriólogo francés Louis Pasteur comprueba científicamente que el deterioro de los alimentos es causado por el crecimiento y multiplicación de microorganismos y evidenció que al calentar ciertos alimentos, como la leche, disminuía en forma sensible el número de microorganismos iniciales (pasteurización).

A partir de la revolución industrial, el procesamiento térmico de alimentos es ampliamente utilizado para la preservación de productos envasados, por su efecto letal en organismos patógenos y de deterioro (Stumbo, 1973). Actualmente el tratamiento térmico de alimentos es aún el método más utilizado para la conservación de los mismos. La esterilización de un alimento por calor persigue su estabilidad, no su esterilidad absoluta, no sólo por razones económicas, sino también por la excesiva degradación que experimentarían la calidad organoléptica y nutricional del producto.

## **2.2 Microorganismos de importancia en el tratamiento térmico**

Los principales microorganismos que participan en el deterioro de los alimentos son: bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Pueden atacar prácticamente todos los componentes de los alimentos, y cuando éstos se contaminan bajo condiciones naturales, es probable que actúen a la vez varios tipos de microorganismos y contribuyan a una serie de cambios simultáneos (Davis et al., 1996).

El conocimiento de las características de estos microorganismos es primordial para el diseño de los procesos térmicos utilizados en la preservación de alimentos envasados. Los mohos, levaduras y bacterias, se presentan como los principales microorganismos de interés, y desde el punto de vista de la tecnología alimentaria aparte de diferir en cuanto a su morfología y fisiología también lo hacen en sus requerimientos de agua, nutrientes, oxígeno, temperatura y la tolerancia a ácidos o agentes químicos (Hersom y Hulland, 1995).



La acidez de un alimento, expresada por su pH denota importancia en la caracterización de deterioro, según el microorganismo nocivo que se presente (Tabla 1). El pH del medio de calentamiento tiene una gran influencia en la termorresistencia de las bacterias, hasta el punto que es considerado como el factor más importante que determina su termorresistencia (López, 2012). La acidez inhibe el crecimiento de los microorganismos o los mata debido a que interfiere con la permeabilidad de la membrana celular.

**Tabla 1:** Deterioro microbiológico en función de la acidez del producto

<i>Alimentos</i>	<i>Microorganismos de referencia</i>
<b>Grupo I: De acidez baja (pH &gt; 5)</b> arveja, choclo, carnes, pescado, leche	Aerobios y anaerobios esporulados Mohos y levaduras Bacterias no esporuladas Microorganismos Flat sour: <i>B. sterothermophilus</i> Putrefactivos: <i>Cl. Sporogeners</i> , <i>Cl botulinum</i> .
<b>Grupo II: De acidez media (pH 4.5 – 5.3)</b> Conservas de espárragos, espinacas, sopas y salsas	Aerobios y anaerobios esporulados Mohos y levaduras Bacterias no esporuladas  Microorganismos formadores de ácidos y gases: <i>Cl. Thermosaccharolyticum</i> <i>Cl. butyricum</i>
<b>Grupo III: ácidos (pH 3.7 – 4.5)</b> Tomate, pera, piña, higo, manzana	Bacterias esporuladas Bacterias no esporuladas Mohos y levaduras Microorganismos Flat sour: <i>B. sterothermophilus</i> Formadores de ácidos y gases: <i>Cl. Pasteurianum</i> , <i>Lactobacillus spp</i>
<b>Grupo IV: muy ácidos (pH &lt; 3.7)</b> Frutas, jugos cítricos, chucrut	<b>Mohos y levaduras</b> <b>Bacterias ácido lácticas</b> <b>Crecimiento de hongos:</b> <i>Bissochlamys fulva</i> .

**Fuente:** Cameron y Esty (1940)

### 2.2.1 Características de las esporas bacterianas

Ferdinand Cohn (1976) estudio la naturaleza y las principales propiedades de las esporas bacterianas, mediante ensayos donde demostraba que eran capaces de sobrevivir en medios sometidos a ebullición, también colaboró con el bacteriólogo Robert Koch; quien

describió el ciclo completo del *Bacillus anthracis* y demostró la relación existente entre las esporas y otros bacilos.

Las esporas bacterianas comienzan a formarse durante la fase estacionaria de crecimiento, cuando se han agotado uno o más nutrientes del medio, pueden sobrevivir en ambientes adversos durante meses o años y, una vez que las condiciones de crecimiento sean apropiadas, pueden germinar y desarrollarse para formar células vegetativas. Las esporas se caracterizan por un bajo contenido de agua y porque no tienen un metabolismo detectable. Además, son altamente resistentes a las altas temperaturas, la congelación, las radiaciones y a la acción de ciertas sustancias químicas (Tabla 2). Su estructura única es la que determina sus propiedades de resistencia (López, 2012).

**Tabla 2.** Factores que influyen en la termorresistencia de las esporas bacterianas

<b>Factores intrínsecos</b>	Características genéticas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Especie</li> <li>2. Cepa y lote de spora</li> </ol>
<b>Factores previos al tratamiento térmico</b>	Condiciones de esporulación	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Medios de esporulación: Formulación; pH, agar, composición del medio.</li> <li>2. Condiciones de incubación: Temperatura, humedad, tiempo, etc.</li> </ol>
	Condiciones de recuperación y limpieza	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Número de lavados</li> <li>2. Aplicación de sonicación</li> </ol>
	Condiciones de almacenamiento	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Medio de almacenamiento: Formulación, pH, Aw.</li> <li>2. Refrigerado, congelado o liofilizado, HR y tiempo</li> </ol>
<b>Factores simultáneos al tratamiento térmico</b>	Condiciones de calentamiento	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Temperatura</li> <li>2. Medio de calentamiento: formulación, pH, Aw.</li> </ol>
<b>Factores posteriores al tratamiento térmico</b>	Condiciones de recuperación	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Condiciones posteriores al tratamiento: temperatura, tiempo.</li> <li>2. Diluyente</li> <li>3. Medio de recuperación: formulación pH, actividad de agua, potencial redox, capacidad tamponadora, tipo de medio; sólido o líquido, siembra en volumen o superficie, efecto de arrastre del diluyente.</li> <li>4. Condiciones de incubación: Temperatura, humedad relativa, composición gaseosa del ambiente, tiempo.</li> </ol>

Fuente: López (2012)

## **2.3 Microorganismos en alimentos de media y baja acidez**

La mayoría de microorganismos están asociados con grupos particulares de alimentos, éstos pueden sobrevivir al tratamiento térmico requerido para su conservación o bien contaminar el alimento después de dicho tratamiento debido a suturas o fugas del envase (Ureña y Elías, 2004). Cuando la contaminación es anterior al tratamiento, es posible predecir el microorganismo responsable si se conoce bien la naturaleza del alimento y las condiciones a las que se ha sometido.

El Instituto de Tecnología de Alimentos de Brasil (1983) indica que los alimentos que ofrecen mayores riesgos son los denominados por la FDA (Food and Drug Administration) como alimentos de baja o media acidez, entendiéndose por tal a “cualquier alimento, excepto bebidas alcohólicas, que presenten una actividad de agua superior a 0.85 y un pH de equilibrio mayor de 4.6”. También se menciona que el nivel de calor empleado en la conservación de los alimentos está en función del grado de acidez, expresado como pH, que determina la flora microbiana existente en el alimento (Tabla 1). En este contexto, los principales microorganismos capaces de alterar conservas vegetales de acidez baja o media son los siguientes:

### **2.3.1 Bacterias esporuladas aerobias**

Las bacterias esporuladas aerobias más difundidas son las del género *Bacillus* (Gonçalves, 1992), que tienen su origen en el suelo y agua, por lo que casi siempre están presentes en las materias primas empleadas en conservas. Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4-10  $\mu\text{m}$ ), gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Una característica importante es que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 28 y 40 °C, aunque existen algunos termófilos que pueden desarrollarse a 55 °C e incluso 70 °C (Gonçalves, 1992). Hanlin (1998) señala que el *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. megaterium* se han asociado tradicionalmente con el deterioro de productos alimenticios, en muchos casos con un pH tan bajo como 3.9.

El deterioro más importante causado por *Bacillus es* del tipo “*Flat sour*”, esta alteración se produce sobre todo en conservas vegetales, el agente causante suele ser el *Bacillus stearothermophilus*, la alteración se caracteriza porque al inspeccionar el envase no se observa daño aparente, sin embargo el contenido es ácido por la producción de ácido láctico, no existiendo producción de gas (Chau-Ching et al., 1968).

### **2.3.2 Bacterias esporuladas anaerobias**

Los anaerobios esporulados proceden principalmente del suelo, por lo que es fácil hallarlos en hortalizas, aunque también es posible encontrarlos en la carne, leche y otros productos alimentarios derivados, debido a que algunas especies se desarrollan en los intestinos del hombre y animales; como el *Cl. perfringens* (Gonçalves, 1992). Con referencia al deterioro, Pascual y Calderón (1999) indican que se debe distinguir dentro del grupo de los *Clostridium* a los termófilos y mesófilos, entre los primeros, los sacarolíticos son los más importantes, produciendo gran cantidad de gas a partir de los carbohidratos, principalmente dióxido de carbono e hidrógeno, lo que da lugar al hinchamiento de las latas, estas alteraciones van acompañadas de un olor butírico, no producen ácido sulfhídrico y la temperatura óptima de desarrollo se sitúa alrededor de los 55 °C apareciendo sobre todo en países cálidos, donde las temperaturas de almacenaje pueden sobrepasar los 35 °C.

Los organismos mesófilos son los segundos en importancia, después de los causantes de la fermentación simple (Pascual y Calderón, 1999). Entre estos destaca el *Clostridium botulinum*, se trata de una bacteria Gram positiva, anaerobia y esporógena cuyo crecimiento queda inhibido a pH menor de 4.5. Sin embargo, los organismos aeróbios de un alimento pueden crecer y usar el oxígeno, creando condiciones anaerobias adecuadas para su desarrollo, por tanto en un producto ácido puede desarrollarse el *C. botulinum*, si está presente, cuando el ácido haya sido utilizado por otros organismos, aumentando el pH. El *C. botulinum* es el más resistente de los microorganismos que intoxican los alimentos, por lo que la industria conservera admite de forma general que todos los productos no ácidos tratados deben cumplir el requerimiento básico necesario para destruirlo: esterilización durante 2.8 minutos a 121.1 °C (Infoagro, 2010).

### 2.3.3 Bacterias esporuladas en la cadena productiva del espárrago blanco

El pH de los turiones de espárragos blancos en estado fresco se encuentra entre 6.0 y 6.1; sin embargo, en la elaboración de estas conservas se adiciona al producto una solución que contiene ácido ascórbico y cítrico, y el pH se reduce aproximadamente a 5.2. Según la clasificación de la Tabla 1, esto produce una conserva de acidez media ( $4.5 < \text{pH} < 5.3$ ). Teniendo en cuenta esta clasificación, se han reportado las siguientes investigaciones sobre los principales microorganismos que alteran las conservas de espárragos:

Velezmoro et al. (2007) identificaron y cuantificaron microorganismos esporulados hallados en cultivares de espárragos blancos de la zona norte del Perú, así como en los diferentes puntos a lo largo de la cadena productiva de conservas de espárragos. El proceso de investigación radicó en la cuantificación microbiológica, aislamiento e identificación de las cepas, aplicando metodología descrita en APHA (1992) y BAM-FDA (2001). Se cuantificaron microorganismos del género *Bacillus*, esporulados mesófilos, aerobios y anaerobios (EMA y EMANA), así como los termófilos respectivos (ETA y ETANA). El estudio demostró que las operaciones de limpieza que se realizan en la planta industrial reducen el número, mas no eliminan los microorganismos esporulados en el producto que será sometido al tratamiento térmico. Al cabo de la investigación se identificaron las siguientes cepas de *Bacillus* importantes para el tratamiento térmico; *B. subtilis* / *amyloliquefaciens*, *B. pumilis*, *B. licheniformis* y *B. megaterium*.

Gimenez (1990) evaluó los niveles de contaminación microbiológica mediante el control de puntos críticos durante el proceso de elaboración de conservas de espárragos. El primer punto crítico fue la operación de lavado, en el cual encontró un aumento en el recuento de microorganismos mesófilos, psicófilos y en especial enterobacterias totales. Otro punto crítico fue el pelado, en el que se disminuyó los recuentos de esporulados aerobios, pero hubo una recontaminación por enterobacterias. El tercero fue la operación de enfriado que prosigue al escaldado, existiendo una recontaminación por mesófilos, en especial esporulados aerobios. Además, en una muestra de espárrago blanco fresco se aisló *Clostridium botulinum* Tipo B.

En Taiwán (1963), a raíz del incremento de la producción de conservas de espárragos se presentaron casos de deterioro *Flat sour* en algunas latas. Chau-Ching et al. (1968)

examinaron el suelo cultivado, espárragos frescos, líquido de gobierno y las conservas antes del cerrado, encontrando una muestra que presentaba olor a podrido. El estudio detectó la presencia de *B. stearothermophilus* como causante del deterioro en las conservas enlatadas de espárragos, también se determinó la resistencia térmica de estas cepas; siendo el parámetro de letalidad  $F$  (a 250°F) de 14.2 min y  $z$  de 17.8 °F.

## **2.4 Destrucción de microorganismos por calor**

Las altas temperaturas obtenidas mediante el fuego y el agua en ebullición se han utilizado para esterilizar y desinfectar desde la época de los griegos. El calor hoy en día es uno de los métodos más comunes para la inactivación de microorganismos patógenos. La temperatura incide en la velocidad de muerte de los microorganismos a medida que aumenta por encima de la óptima de crecimiento (Prescott et al., 1999). Es por ello habitual que en un control microbiológico se utilicen altas temperaturas.

Los ácidos nucleídos ADN y ARN son los portadores de la información genética de la célula, el daño de estos ácidos, por calor u otro agente físico, con frecuencia resulta letal para la célula, que ya no podrá replicarse ni llevar a cabo funciones metabólicas normales como la síntesis de enzimas. El calor húmedo es mucho más eficiente que el seco, ya que este actúa mediante la coagulación de las proteínas celulares (desnaturalización), ocasionando la rotura de enlaces hidrogeno que mantienen la estructura tridimensional (Tortora et al., 2007). El principal método de inactivación microbiana que emplea calor húmedo, es el vapor a presión, que utilizan las autoclaves (vapor de agua saturado) a una presión de 15 lib/pulg<sup>2</sup>, lo que permite que la cámara alcance una temperatura de 120°C. Por otro lado, Huertas (2008) menciona que el calor seco destruye la célula por la oxidación de sus componentes celulares, este es un proceso menos eficiente (para alimentos) que la esterilización por calor húmedo, el calor seco se emplea en materiales de vidrio, instrumentos quirúrgicos, agujas de metal, materiales no miscibles con el agua, etc.

La sensibilidad de los microorganismos a los tratamientos térmicos es diferente, las esporas son más termorresistentes que las células vegetativas y los microorganismos Gram-positivos lo son más que los Gram-negativos. Según Tortora et al. (2007) la resistencia al calor varía entre los diferentes microorganismos, esta diferencia puede

expresarse a través del concepto del Punto de Muerte Térmica (PMT), que es la temperatura más baja necesaria para causar la muerte de todas las bacterias en una suspensión líquida particular en 10 minutos (López, 2012).

## **2.5 Medida de la termorresistencia de microorganismos**

Existen dos sistemas para medir la termorresistencia de microorganismos:

*a) Sistemas de calentamiento indirecto*, donde los microorganismos no entran en contacto con el fluido calefactor (Brown et al., 1988). Una suspensión de microorganismos es inoculado en un sustrato que puede ser tampón fosfato o puré del propio alimento, se disponen en pequeños tubos capilares para alimentos líquidos o semisólidos que son calentadas en un baño termostatzado de agua o aceite. El desarrollo del presente trabajo, se aproxima a este sistema utilizando discos de aluminio TDT adquiridos de la Universidad Estatal de Washigton.

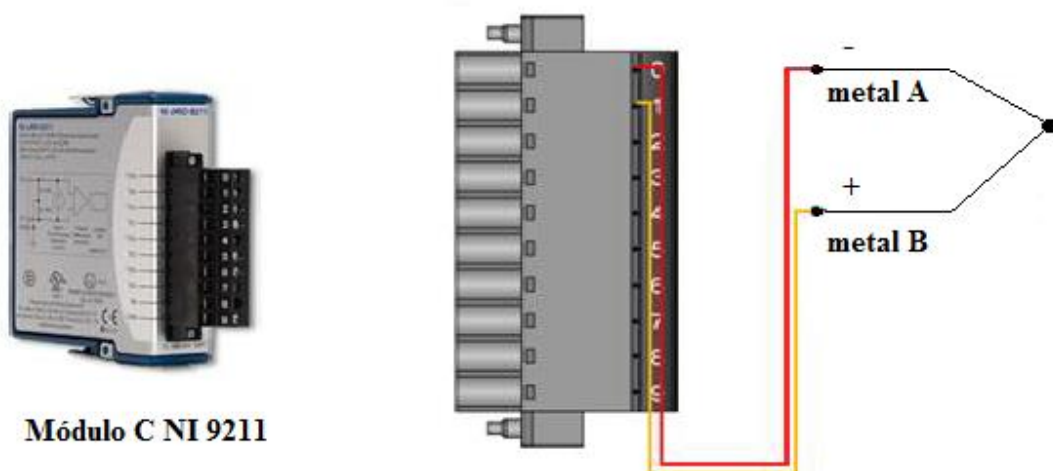
*b) Sistemas de calentamiento directo*, en los que no existe una separación física entre el fluido calefactor y la suspensión de microorganismos. Entre los métodos directos se encuentran los sistemas basados en la mezcla de pequeñas cantidades de esporas con grandes cantidades de sustrato caliente en agitación dentro de un recipiente herméticamente cerrado (Brown et al., 1988), como el método del matraz en el cual el sustrato se calienta a la temperatura deseada previamente a la inoculación de esporas; además permite estudiar el comportamiento de las esporas frente a cambios de pH o composición del sustrato. Existen también termorresitómetros, los cuales son sistemas que someten directamente al sustrato con las esporas a la acción del fluido calefactor que suele ser vapor de agua. Stumbo (1973) diseñó el primer termorresistómetro para estudiar esporulados de alta termoresistencia como *Clostridium sporogenes* y *Clostridium botulinum* a temperaturas comprendidas entre 104 y 150 °C.

### 2.5.1 Adquisición de datos de temperatura

La medición de temperatura por medio de sondas conectadas se torna posible mediante el cableado a un sistema de registro externo; un equipo que permite esta adquisición de datos es el módulo de termocuplas de Series C NI 9211 (National Instruments). El C NI 9211 (Figura 1) posee un conector removible, con 10 terminales de tornillo, que provee las conexiones para cuatro canales de entrada. Cada canal posee un terminal al cual se puede conectar el cable positivo del termopar, TC+, y un terminal al cual puede conectar el cable negativo, TC-. El software de programación grafica *LabVIEW* (National Instruments) permite transferir los datos de temperatura desde el interior del computador hacia los objetivos de visualización y análisis.

### 2.5.2 Termocuplas

Un termopar o termocupla (Figura 1) es un sensor de temperatura que consta, en esencia, de dos hilos conductores de metales diferentes unidos por sus extremos, si estas uniones se encuentran a temperaturas distintas, se produce un diferencia de potencial eléctrico que es proporcional a la diferencia de temperaturas (efecto *Seebeck*), también denominada fuerza electromotriz termoeléctrica (León, 2010). La termocupla tipo T (Cobre – Constantan) es de uso alimentario ya que resulta adecuada para atmósferas medianamente oxidantes o reductoras y resiste bien la humedad. El margen de temperaturas en que puede utilizarse es de 0 a 350 °C con un error del 0,4 al 0,75 % (+/- 0,5 a 1 °C).

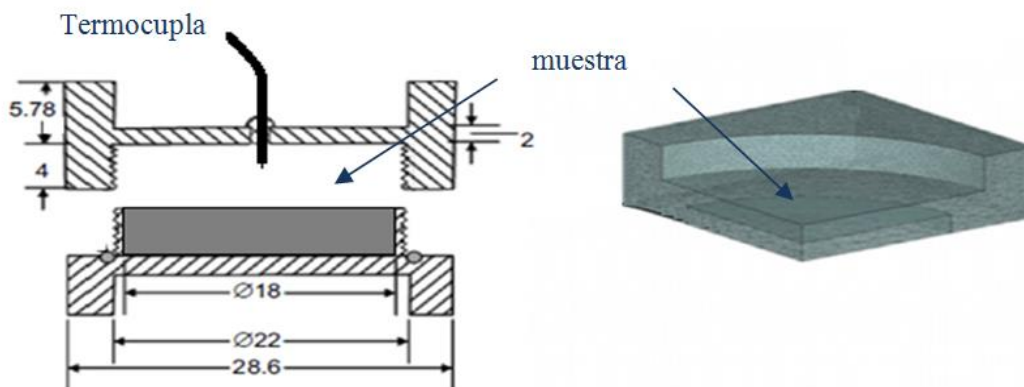


**Figura 1.** Sistema de medida con termocuplas



### 2.5.3 Discos TDT ( Thermal Death Time disk)

Los discos de aluminio TDT utilizados en la presente investigación fueron diseñados en la *Washington State University* con la finalidad de evaluar la resistencia térmica de microorganismos y su cinética de inactivación por calor. Estos instrumentos permiten el rápido calentamiento de la muestras (Jin et al., 2007), con un breve *come-up time* (CUT, tiempo necesario para que el núcleo de la muestra alcance 0.5 °C por debajo de la temperatura objetivo del proceso) proporcionando condiciones muy cercanas a las de un proceso isotérmico. En la Figura 2 se aprecia de forma esquemática estos equipos, que constan de dos partes: una base y tapa atornillada fabricadas con aluminio alloy 6061 (Chung et al., 2007) y un anillo de goma para lograr hermeticidad, además cuentan con un sensor de temperatura tipo T (Cobre – Constantan), instalado en el centro del disco que registra la temperatura al interior. Los discos TDT tienen un diámetro interno de 18 mm y una altura de 4 mm, además la capacidad de cada disco es de 1.27 ml.



**Figura 2.** Representación esquemática de los discos

Chung et al. (2007) evaluaron el funcionamiento de los discos de aluminio TDT en la determinación de la resistencia térmica de esporas *Clostridium sporogenes* PA 3679, utilizando papa machacada como medio inoculado. Se determinó el parámetro *D* y los resultados fueron comparados con otros métodos, como el de tubos capilares y tubos de aluminio. De manera similar, Jin et al. (2007) analizaron la resistencia térmica de cepas de *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* K12 en huevo empleando los discos de aluminio TDT, esta investigación no comparó los resultados obtenidos con la de otros dispositivos similares.

Yuk et al. (2009) contrastó resultados de parámetros cinéticos utilizando discos TDT con los de un pasteurizador a escala. Se inactivó térmicamente cepas de *Escherichia coli* K12 en sidra de manzana, el estudio concluyó que no hubo diferencias significativas en los resultados de valores  $D$  entre ambos métodos. Sin embargo, la facilidad de uso y otros factores sirvieron para que los discos TDT fueran recomendados en la obtención de parámetros cinéticos de inactivación térmica.

#### 2.5.4 Microorganismos usados como indicadores

Para la evaluación de la inocuidad en alimentos se utilizan organismos indicadores, por lo que se han investigado sus parámetros de destrucción térmica, como los valores  $D$  y  $z$ , que varían para cada microorganismo y para cada condición (Tabla 3). Las esporas, por ejemplo, tienen valores  $D$  mucho más altos que las células vegetativas de los mismos microorganismos.

**Tabla 3.** Valores de  $D$  y  $z$  para diferentes microorganismos

<i>Microorganismos</i>	<i>Temp (°C)</i>	<i>D (s)</i>	<i>z (°C)</i>
<b><i>Bacillus stearothermophilus</i></b>			
<b>FS 7954 (en tampón fosfato)</b>	121	6.0	8.3
<b>NCBI 8919</b>	121	186	7.0
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>			
<b>5230 (en agua)</b>	121	6.0	8.3
<b>5230 (en tampón fosfato)</b>	121	21.9	8.8
<b><i>Clostridium botulinum</i></b>			
<b>Tipo A (en agua)</b>	121	6.0	8.3
<b>A35B (en tampón fosfato)</b>	121	19.2	10.8
<b>213B (en vegetales)</b>	121	6.6	9.8
<b>213B (en tampón fosfato)</b>	110	96	10.3
<b>62A (en puré de guisantes)</b>	121	5.3	8.3
<b><i>Clostridium thermosaccharolyticum</i></b>			
<b>S9 (en agua)</b>	132	4.4	6.9
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
<b>en agua</b>	55	402	3.6

Fuente: Casp y Abril (1998)

Las esporas de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus stearothermophilus* son usadas frecuentemente como organismos de prueba para determinar el efecto esterilizante de un equipo UHT, ya que estas bacterias - especialmente el *B. stearothermophilus* - forman esporas altamente resistentes al calor. El *Clostridium botulinum* es usado para el cálculo del efecto de la esterilización realizada con el producto dentro del recipiente. El análisis microbiológico de alimentos para la búsqueda de estos microorganismos suele utilizar técnicas sencillas y accesibles (Hanlin, 1998).

## 2.6 Métodos para la determinación de los parámetros cinéticos

A comienzos del siglo XX se dieron las primeras investigaciones sobre la cinética de termodestrucción microbiana, entre los investigadores más destacados podemos citar a W. D. Bigelow quien, en 1921, dio las bases para el desarrollo del método gráfico o también llamado Método General; aplicable cuando se conocen las condiciones de tiempo – temperatura del autoclave, los datos tiempo – temperatura de penetración de calor y la temperatura del agua de enfriamiento. Otro investigador de importancia fue el Dr. Olin Ball, quien en 1923 propuso un método analítico, denominado posteriormente como Método de la Formula de Ball, que permite calcular el tiempo de proceso térmico, siempre que la velocidad de penetración de calor del producto dé una línea recta al ser graficada en un papel semi - logarítmico.

### 2.6.1 Métodos isotérmicos

León (2010) menciona que las cinéticas térmicas se basan en cuantificar el efecto del calor conseguido al aplicar una temperatura constante sobre un alimento, en función de la velocidad con la que los cambios que provoca en él se llevan a cabo. La velocidad de destrucción térmica de microorganismos se ajusta, por lo general, a una cinética de primer orden respecto a la población microbiana:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^n \quad (1)$$

Donde C representa el número de microorganismos vivos,  $t$  el tiempo de tratamiento y  $k$  la constante de la reacción. Cuando se trata de una reacción de primer orden, la integración de esta ecuación conduce a las siguientes expresiones:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-k(t-t_0)} \quad (2a)$$

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k \cdot (t - t_0) \quad (2b)$$

Siendo  $t_0$  = tiempo de inicio

Se establece así una relación logarítmica entre la tasa de reducción de microorganismos y el tiempo de tratamiento. Esta cinética se realiza a temperatura constante, donde  $k$  depende de la temperatura. Según la ecuación de Arrhenius, la constante de velocidad de reacción varía:

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (3)$$

Donde  $E_a$  (Energía de activación, kJ/mol),  $k_0$  (Constante de velocidad, factor pre-exponencial, 1/s) son los parámetros cinéticos,  $T$  es la temperatura absoluta y  $R$  la constante molar de los gases (8.314 J/mol K).

Bajo condiciones isotérmicas, la extensión de la reacción puede ser determinada por sustitución de la ecuación (3) en (2b):

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -K_0 \cdot e^{\left\{\frac{-E_a}{RT}\right\}} \cdot (t - t_0) \quad (4)$$

Según Lenz y Lund (1980) las aproximaciones isotérmicas para la determinación de parámetros cinéticos son las que se utilizan con mayor frecuencia, debido a su simplicidad conceptual. Sin embargo, se mencionan en algunas publicaciones (Welt et al., 1997a) que los parámetros resultantes influyen en el diseño de productos y procesos específicos, esto debido a que las condiciones de procesamiento son a menudo sustancialmente diferentes de las condiciones isotérmicas ideales.

## 2.6.2 Métodos no isotérmicos

Aunque muchos de los procesos de tratamiento térmico de alimentos son de carácter no isotérmico, el método más común para determinar los parámetros cinéticos fue asumir que se da una reacción de primer orden y llevar a cabo tres o más pruebas isotérmicas (Dolan, 2003). La razón fue, que las pruebas isotérmicas generalmente son más sencillas, tanto en su diseño como en el análisis de datos. Sin embargo, los enfoques no isotérmicos se presentan interesantes debido a que están específicamente diseñados para dar cabida a las transiciones térmicas permitiendo la determinación de parámetros cinéticos a partir de las condiciones de transformación real, que puede ser más útil en el diseño de un proceso específico (Welt et al., 1997a).

Algunas dificultades que presentan los experimentos isotérmicos son:

- Rango de temperatura limitada.
- Omisión del tiempo de transferencia de calor, cuando las muestras son calentadas desde temperatura ambiente hasta la temperatura de reacción y al enfriarse.
- Tediosa preparación de muestras pequeñas; necesarias para reducir los tiempos de espera.
- Necesidad de utilizar soluciones simuladoras en lugar del producto real.
- Diferencia significativa entre las condiciones de procesamiento experimental y real.
- Dificultad en la obtención de datos estadísticamente válidos a altas temperaturas cuando las velocidades de reacción son muy rápidas y requieren tiempos de exposición cortos; que no pueden ser controladas con precisión.

Los métodos no isotérmicos utilizan datos de experimentos en los cuales la temperatura varía en todo el rango de interés y las muestras se toman en varias ocasiones. Los parámetros se estiman a partir de un entorno dinámico más cerca de las condiciones de un proceso comercial (Dolan, 2003). Aunque los métodos no isotérmicos, por lo general representan un verdadero proceso con mayor precisión, se han utilizado principalmente para confirmar, en lugar de estimar parámetros cinéticos (Dolan, 2003).

## 2.7 Método PEIE

En 1982, el Dr. Kenneth Swartzel propone el “Método del Punto Equivalente” (EPM), investigación que fue reconocida por el *Institute of Food Technologists* (Giese, 1994).

Este fue un reconocimiento al valor práctico de los métodos no isotérmicos para la estimación de parámetros cinéticos en la industria de alimentos (Welt et al., 1997a). El EPM es un método de fácil uso que se basa en la presunción que un proceso equivalente isotérmico puede ser obtenido por procesos térmicos dinámicos (no isotérmicos). Sin embargo, en 1997 el Dr. Bruce Welt y colaboradores demostraron una premisa inexacta del EPM, que era la independencia del valor de la  $E_a$  en la obtención de los puntos equivalentes; a menos que se trabajen con valores muy cercanos a los valores reales (datos bibliográficos). Welt et al. (1997a) tomaron como base las exposiciones equivalentes isotérmicas (EIE) propuesto por Swartzel y desarrollaron un método alternativo para la estimación de parámetros cinéticos en condiciones no isotérmicas, este nuevo método fue denominado como PEIE (*Paired Equivalent Isothermal Exposure*).

El método PEIE es un proceso matemático que se sustenta en la cinética de destrucción térmica, como se observa en las ecuaciones (1), (2), (3) y (4). Siendo en la ecuación (5) que se cambia la extensión de la reacción, al adicionar la historia térmica  $T_{(t)}$  (temperatura en función del tiempo, en vez de la temperatura absoluta) determinándose la nueva ecuación bajo condiciones, a partir de esta etapa, no isotérmicas, debido a que se tomarán todos los datos de temperatura según el tiempo de cada tratamiento.

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -K_0 \cdot \int_{t_0}^t e^{\left\{\frac{-E_a}{R \cdot T(t)}\right\}} dt \quad (5)$$

Siendo  $T_{(t)}$  = Temperatura en función del tiempo (historia térmica)

El método del punto equivalente EPM elaborado por Swartzel (1982) iguala las ecuaciones (5) y (4) adicionando un paso de normalización, que consiste en dividir la igualdad entre  $-k_0$ , tomando las ecuaciones la siguiente forma:

$$\frac{\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)}{-k_0} = G = \int_{t_0}^t e^{\left\{\frac{-E_a}{R \cdot T(t)}\right\}} dt = t_e \cdot e^{\left\{\frac{-E_a}{R \cdot T_e}\right\}} \quad (6)$$

Donde  $G$ , definido por Swartzel (1982), es el valor obtenido de evaluar la integral de los datos de historia térmica (mediante el método de integración numérica de Simpson de 1/3). De forma similar que el valor  $F_0$ , el tiempo equivalente,  $t_e$ , a temperatura equivalente,  $T_e$ , comprenden una exposición isotérmica, la cual podría proveer de manera equivalente a una extensión de reacción (letalidad) de un proceso térmico dinámico (Welt et al., 1997a).

Swartzel (1982) citado por Welt et al. (1997a) observó que la ecuación de una línea recta de la forma:

$$\ln(t_e) = \ln(G) + \frac{E_a}{R \cdot T_e} \quad (7)$$

resulta de igualar los valores de  $G$  a la parte isotérmica de la ecuación (6). Utilizando varias de estas ecuaciones con valores de  $E_a$  arbitrariamente tomadas, Swartzel (1982) trazó rectas sobre un plano de  $\ln(t_e)$  vs  $1/T_e$ , reportando que las líneas tenían una tendencia a intersectar en una región particular del plano. Se indicó que todas las líneas intersectaban en un punto (Método del Punto Equivalente, EPM). Sin embargo el EPM especifica la necesidad de más de una energía de activación para definir los procesos equivalentes, algebraicamente, no más de dos son necesarios (Welt et al., 1997a).

$$G = t_e \cdot e^{\left\{\frac{-E_a}{R \cdot T_e}\right\}} \quad (8)$$

Dos series de valores de  $E_a - G$  producen dos ecuaciones con dos variables desconocidas:  $T_e$  y  $t_e$ , las cuales pueden ser obtenidas resolviendo el siguiente sistema de ecuaciones lineales:

$$\ln(G_1) = \ln(t_e) - \frac{E_{a1}}{R \cdot T_e} \quad (9a)$$

$$\ln(G_2) = \ln(t_e) - \frac{E_{a2}}{R \cdot T_e}$$

$$T_e = \frac{(E_{a2} - E_{a1})}{R \cdot \ln(G_1 / G_2)} \quad (9b)$$

El tiempo equivalente,  $t_e$ , es encontrado por sustitución de la  $T_e$  en cualquiera de las ecuaciones (9a). En el método PEIE desarrollado por Welt et al. (1997a) se menciona que una vez determinadas las exposiciones isotérmicas equivalentes (EIE), se adicionan más ecuaciones diferentes al método del Punto Equivalente; para la obtención de los parámetros cinéticos, por ejemplo la constante de velocidad isotérmica ( $k^T$ ) la cual depende de la cantidad de microorganismos final e inicial y el  $t_e$ . Los autores mencionan que la confiabilidad del método depende en gran medida de una buena recopilación de datos experimentales.

## 2.8 Espárragos

El espárrago (*Asparagus officinalis*) es una hortaliza originaria de Asia, su cultivo en el Perú se inicia a principio de los años 50 en el departamento de La Libertad con la variedad Mary, siendo ésta desplazada en la actualidad principalmente por la variedad UC 157 F1 (IPEH, 2009).



**Figura 3.** Turiones de espárragos

El espárrago blanco a diferencia del verde, crece debajo de la tierra y no debe recibir la luz del sol (Figura 3). En el momento en que emerge del surco en el que crece, la punta adquiere un color verde o violeta por el efecto de la luz solar, lo que hace que varíe su clasificación comercial; como consecuencia, la recolección debe efectuarse de forma



manual, abriendo un pequeño agujero en el surco y extrayendo el espárrago con bastante cuidado. Esta recolección supone un mayor costo, lo que hace que los espárragos blancos tengan un precio más elevado en el mercado que los verdes (IPEH, 2009). El cultivo del espárrago en el Perú presenta grandes ventajas debido al clima y suelos favorables de la costa, factores que sumados al buen uso de la tecnología le permiten alcanzar rendimientos de primer orden a nivel mundial.

### 2.8.1 Espárragos en conserva

La norma CODEX STAN 56 (1981) define el producto “espárragos en conserva” como aquellos preparados con la porción comestible de tallos, pelados o sin pelar, de variedades de espárragos que reúnen las características del *Asparagus officinalis L.*; envasado en agua u otro medio de cobertura líquido apropiado, con o sin otros ingredientes adecuados al producto; y tratado térmicamente en forma adecuada, antes o después de ser encerrado herméticamente en un recipiente (Figura 4) , para impedir su alteración.



**Figura 4.** Conservas de espárragos.

### 2.8.2 Producción nacional

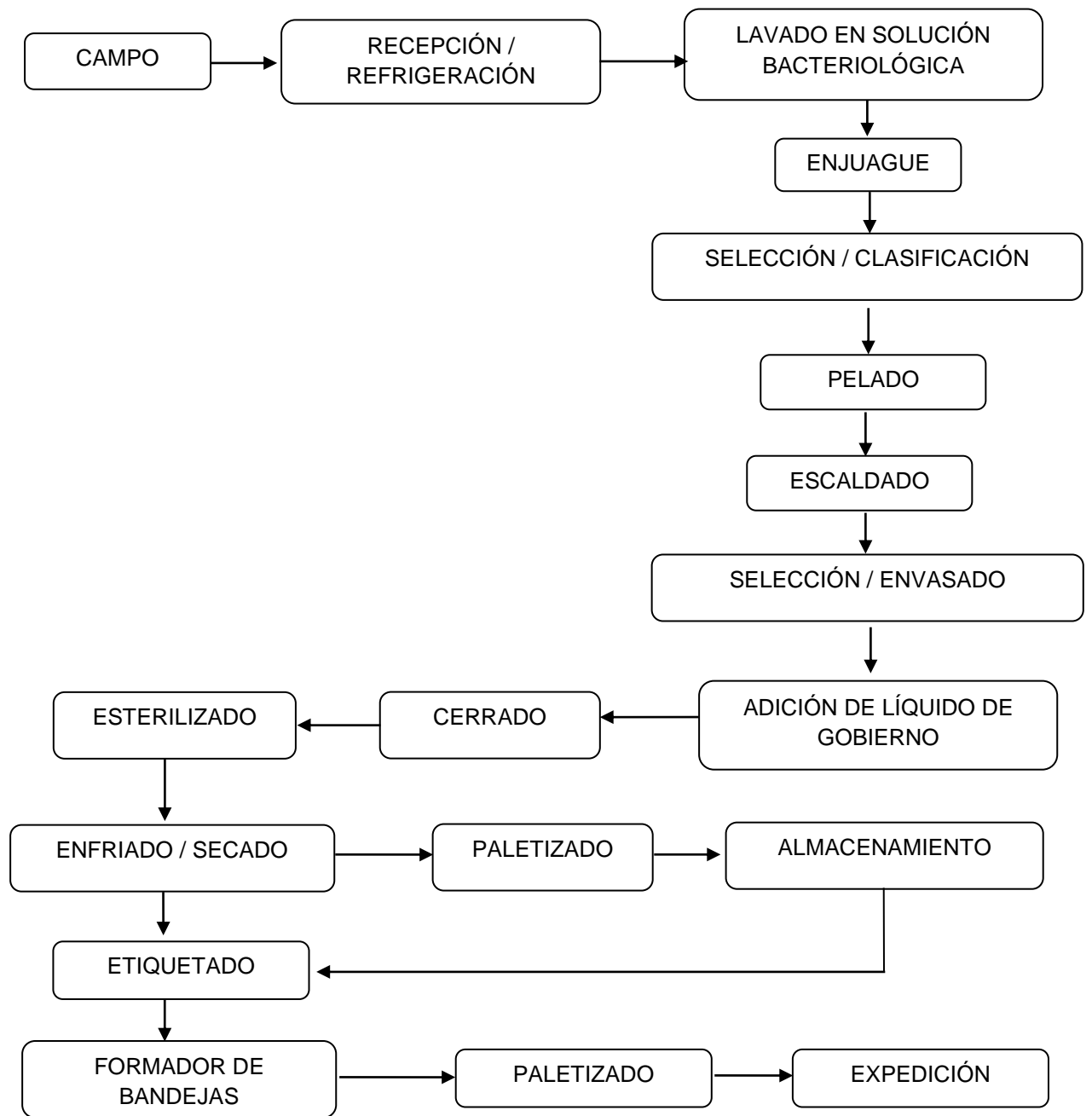
El espárrago es el producto abanderado de las exportaciones hortofrutícolas peruanas, se produce casi exclusivamente para el mercado externo, siendo los cultivos centralizados en la costa, y el departamento de La Libertad la zona de mayor rendimiento y producción (Figura 5). El Perú es el segundo exportador mundial de espárragos en conserva con el

43% del volumen total, el primer lugar lo ocupa China con el 45%. Según el VI Censo Nacional de Productores y Exportadores de Espárragos, realizado a fines del 2013, en el Perú se cultivan 26 184.20 hectáreas de espárragos, siendo su costa norte la zona de mayor de producción (IPEH, 2014).



**Figura 5.** Zonas de producción de espárrago en el Perú

Siendo el espárrago peruano un producto de exportación, su producción se da en un enfoque global, con sistemas de vigilancia que garantizan su inocuidad y calidad a lo largo de toda la cadena productiva (Figura 6).



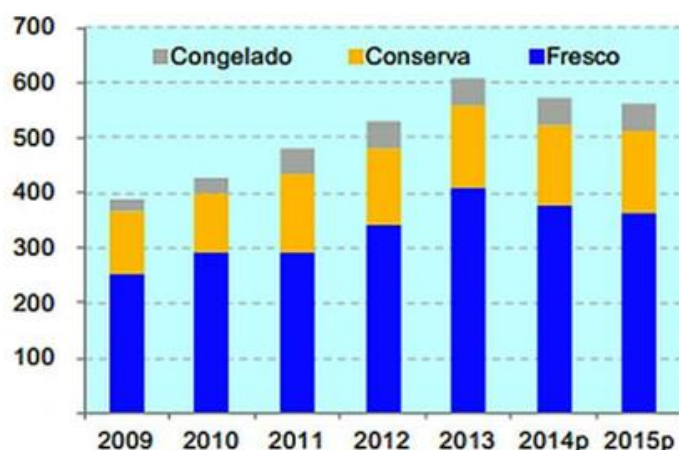
**Figura 6.** Flujo de elaboración de conservas de espárragos blanco.

En el campo, con la implementación de buenas prácticas agrícolas; en el proceso, a través del sistema HACCP; en el almacenamiento y despacho, mediante un adecuado control de calidad (Figura 6). La industria del espárrago aplica adicionalmente otros sistemas de calidad compatibles con el sistema HACCP, los cuales son demandados por los clientes a efectos de asegurar la gestión de la calidad.

### 2.8.3 Exportación de espárragos

La exportación peruana de espárragos, es reconocida como una de las actividades económicas más dinámicas de los últimos años. El Perú comercializa espárragos en tres presentaciones: frescos, conservas y congelados (Figura 7). Alrededor del 68% de las exportaciones corresponde a espárrago fresco, 24% al espárrago en conserva y un 8% a congelados (El Comercio, 2014).

El Perú es el primer exportador de espárragos frescos a nivel mundial, siendo su principal mercado los Estados Unidos de Norte América. En cuanto se refiere a exportaciones de espárragos en conserva, en el año 2013, se comercializó 149,6 millones de dólares. Sus principales mercados de destino son España, Francia y Estados Unidos.



p: Proyectado SBP  
Fuente: MINAG, 2014 Elaboración: Estudios económicos Scotiabank

**Figura 7.** Exportaciones de espárragos por tipo (millones de dólares)

### 2.9 Programación con Visual Basic .NET 2010

La palabra “Visual” hace referencia al método que se utiliza para crear la interfaz gráfica de usuario. En lugar de escribir numerosas líneas de código para implementar la interfaz, simplemente se utiliza el *mouse* para agregar objetos prefabricados en el lugar deseado de la pantalla (Carrasco, 2006). La palabra “Basic” hace referencia al lenguaje *BASIC* (*Beginners All-Purpose Symbolic Instruction Code*), un lenguaje de programación utilizado

por más programadores que ningún otro lenguaje de programación en la historia de la informática (Carrasco, 2006).

*Visual Basic* es un lenguaje de programación con ambiente de desarrollo gráfico de aplicaciones para el sistema operativo *Microsoft Windows* (Carrasco, 2006). *Visual Studio .NET 2010* es un Entorno Integrado de Desarrollo (también conocido como IDE por sus siglas en inglés, Integrated Development Environment), que *Microsoft* ha desarrollado para la creación de *Software* enfocados a realizar aplicaciones para trabajar con *Microsoft Office*. Así mismo se menciona que *Microsoft Visual Studio .NET 2010* es una herramienta que ayuda a los programadores de Aplicaciones Web a realizar sus Proyectos mucho más rápido ya que presenta nuevas funcionalidades como el *IntelliSense* para *JavaScript*, además los desarrolladores han logrado que se pueda seguir ubicando las ventanas en el espacio de visualización del IDE o bien optar por desplazarlas a otra parte del escritorio o a otro monitor adaptando la presentación a diversos gustos, manteniendo los datos actualizados.

### **2.9.1 Programación Extrema (XP)**

Metodología seguida para el desarrollo del *softwares* (utilizada en la presente investigación). La programación extrema (denominada XP por sus siglas en inglés *eXtreme Programming*) es una metodología de desarrollo ágil, basada en una serie de valores y prácticas que persigue el objetivo de aumentar la productividad a la hora de desarrollar programas. Este modelo de programación se basa en una serie de metodologías de desarrollo de *software* en la que se da prioridad a los trabajos que dan un resultado directo. Una de las características principales de este método, es que sus ingredientes son conocidos desde el principio de la informática. Los autores de XP han seleccionado aquellos que han considerado mejores y han profundizado en sus relaciones y en cómo se refuerzan los unos con los otros. El resultado de esta selección ha sido esta metodología única y compacta. Por esto, aunque no está basada en principios nuevos, sí que el resultado es una nueva manera de ver el desarrollo de *software*. El objetivo que se perseguía en el momento de crear esta metodología era la búsqueda de un método que hiciera que los desarrollos fueran más sencillos, aplicando el sentido común.

Calero (2003) menciona que la programación extrema se basa en la simplicidad, la comunicación y el reciclado continuo de códigos, para algunos no es más que aplicar pura lógica, este autor también indica que los objetivos de XP son muy simples: la satisfacción del cliente, esta metodología trata de dar al cliente el *software* que él necesita y cuando lo necesita. El segundo objetivo es potenciar al máximo el trabajo en grupo. Tanto los jefes de proyecto, los clientes y desarrolladores, son parte del equipo y están involucrados en el desarrollo del *software*.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de ejecución

Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) Lima - Perú.

#### 3.2 Material Biológico

##### Cepas de *B. subtilis/amyloliquefaciens*

Las cepas que se utilizaron en la investigación fueron obtenidas de estudios previos (Velezmoro et al., 2009) del cultivo y procesamiento de espárragos para exportación (Trujillo – Perú), estas muestras se tomaron de toda la cadena productiva de espárragos blancos en conservas, desde los suelos de campo de cultivo, hasta el producto envasado antes de su esterilización (Tabla 4).

**Tabla 4.** Identificación de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

Código	Grupo Esporogénico	Procedencia de la cepa	Taxón significativo (API 50 CHB)
2M2CE	Esporulado Mesófilo Anaerobio	Control de esterilidad	<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> Excelente identificación 99.9 % ID

Fuente: Velezmoro et al. (2009)



**Figura 8.** *B. subtilis/amyloliquefaciens*

### **Espárragos (*Asparagus Officinalis*) blancos**

Se trabajó con conservas de espárragos blancos enteros provenientes de la costa norte del Perú (Figura 9), adquiridos en comercios de la ciudad de Lima - Perú. Los datos obtenidos para los ensayos fueron: pH 5.18, Actividad de agua 0.983 y 1.2% de sal.



**Figura 9.** Espárragos blancos en conserva



### 3.3 Materiales y Equipos

#### ➤ **Materiales**

Fluido Thermal H2OS Julabo

Micropipetas de 10-100  $\mu\text{L}$  y de 100 – 1000  $\mu\text{L}$

Tips de 100  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$

Placas Petri estériles de plástico, 100 x 15 mm.

Frascos de vidrio estériles (Pyrex)

Tubos Eppendorf

Asas de inoculación (Asa de Kölle)

Vórtex Mixer (Wizard & Classic Velp)

Tubos de ensayo (Pyrex) con tapa

Bandejas de plástico

#### ➤ **Equipos**

Microscopio NIKON Eclipse E200

Estufa LAB LINE Modelo 305M – 1

Autoclave

Potenciómetro de mesa Hanna Instruments

Espectrofotómetro GENESYS 10UV a 600 nm.

Centrífuga de Mesa MPW Med. Instruments - Modelo, MRW - 223e

Cabina de Bioseguridad Marca, JSR - Modelo, JSCB - 1200SB

Baño de circulación con controlador programable Brookfield modelo TC-202P

Discos TDT (aluminio) adquiridos de la Washigton State University, USA

Discos TDT con termocupla tipo T (Cobre Constantan)

Modulo NI 9211 de entrada de termocuplas de 4 canales.

Laptop Sony VAIO

#### ➤ **Medios de cultivo**

Agar TGE (Tryptona, Glucosa, Extracto de carne)

Medio de esporulación (modificado de Kim y Taylor, 1966)

Solución buffer fosfato Butterfield's (pH 7)

Solución buffer McIlvaine (pH 4)

## Programas

*Microsoft Excel 2007*

*LabVIEW Signal Express National Instruments*

*Microsoft Visual Studio .NET 2010*

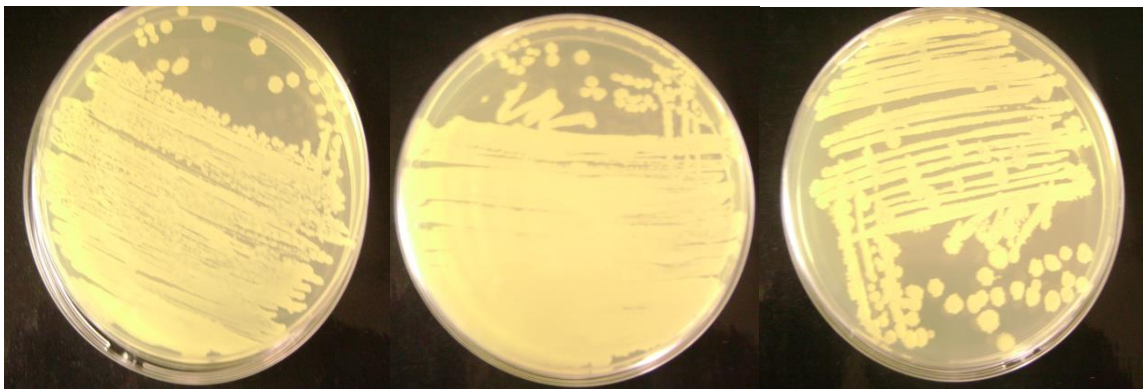
## 3.4 Metodología

### 3.4.1 Activación de Microorganismos

En condiciones de esterilidad, se tomó una muestra de cepas *B. subtilis/amyloliquefaciens*, plenamente identificadas, rotuladas (Tabla 4) y conservadas a  $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ , estas fueron sembradas hasta en cinco ocasiones por agotamiento en agar TGE e incubadas a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , luego de 24 horas se observó su crecimiento sin contaminación (Figura 8).

### 3.4.2 Producción de esporas en medio solido

Se sembraron cultivos de cepas *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* por estría sobre la superficie de las placas Petri con el medio de esporulación (modificado de Kim y Naylor, 1966) que contenía sales de manganeso. Las placas invertidas fueron incubadas en estufa a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 5 días (Figura 10).



**Figura 10.** Producción de esporas

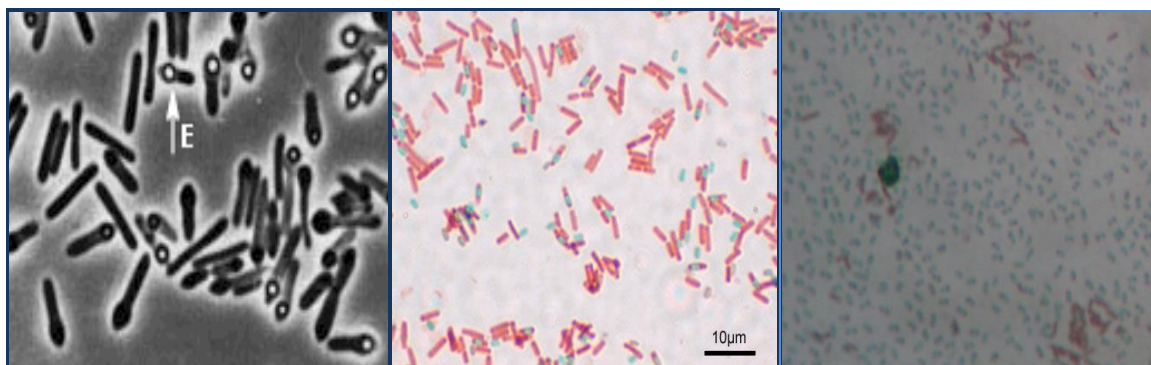
### 3.4.3 Tinción de esporas (Método de Wirtz)

#### a. Fijación de la muestra

Se rotularon convenientemente cada una de las láminas portaobjetos. En cada lamina se colocó una gota de solución salina al 0.85%, posteriormente se fijaron las muestras por extensión y calor con la ayuda de una Asa de Kölle.

#### b. Coloración de la muestra

Se agregó colorante verde de malaquita al 5% hasta cubrir toda la lámina, la cual se calentó hasta la emisión de vapores, este procedimiento se repitió tres veces, evitándose que hierva o que se seque el colorante. La lámina se enjuagó con agua destilada y se procedió a agregar safranina, se dejó actuar por 30 segundos. Finalmente se lavó la lámina con abundante agua destilada y se dejó secar. Una vez que la lámina estuvo totalmente seca, se colocó sobre ella una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio (Figura 11).



**Figura 11.** Tinción de esporas *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*

### 3.4.4 Cosecha, Purificación y Almacenamiento de esporas

Cada 24 horas a partir de la siembra de *B. subtilis/amyloliquefaciens*, en el medio de esporulación, se realizó la tinción de esporas (método de Wirtz), comprobándose su presencia por observación en el microscopio (Figura 11). Sin embargo, la cosecha se realizó a las 72 horas, una vez que se observó la presencia suficiente de esporas. Se procedió a cosecharlas con la ayuda de una pipeta y en medio de agua destilada esteril; trasladando la suspensión (agua-esporas) de las placas petri hacia tubos de centrifugación,

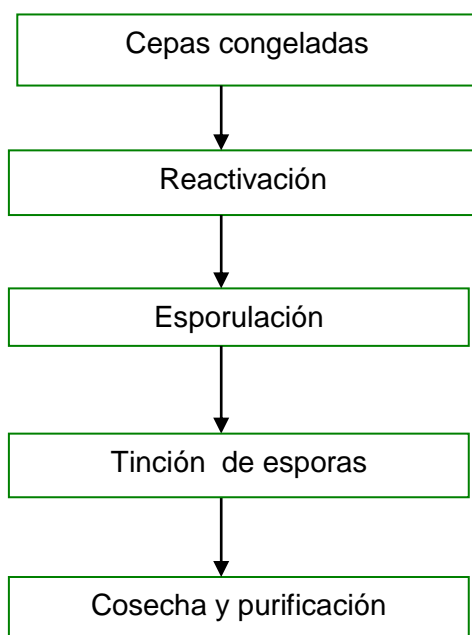
para posteriormente realizar el lavado por tres veces (4000 x g por 10 minutos), descartando el sobrenadante (Velezmoro et al., 2009). Para finalizar esta operación, se reconstituyó el sedimento, resuspendiéndolo en una cantidad de agua destilada esteril suficiente para obtener una concentración al 1-2% de transmitancia, medida en el espectrofotometro a 600 nm, correspondiente a una concentración aproximada a  $10^9$  esporas/mL (Velezmoro et al., 2009). Las suspensiones de esporas se almacenaron a 4 °C (Figura 12).

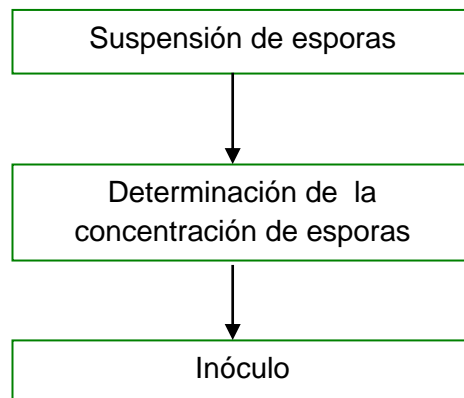
### 3.4.5 Recuento de bacterias esporogénicas

Para el conteo de bacterias esporogénicas, los tubos que contenían las suspensiones de esporas fueron sometidos a un tratamiento térmico de 80°C por 30 minutos. En el caso del conteo de células totales la siembra se efectuó directamente (sin tratamiento térmico). Para ambos procedimientos se realizaron cinco diluciones con solución buffer fosfato

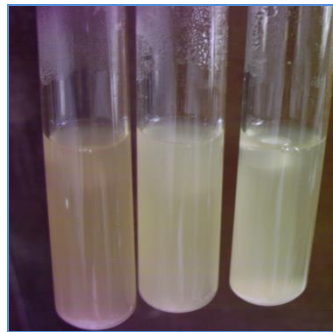
*Butterfield's* (pH = 7), posteriormente se sembraron por incorporación en medio TGE, las placas Petri fueron incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas (Jin et al., 2007), cada procedimiento se realizó por triplicado.

Para expresar los resultados, se cumplió con el recuento de las colonias superficiales y subsuperficiales de cada una de las cinco placas. El número de colonias fue multiplicado por el factor de dilución.





**Figura 12.** Preparación del inóculo



**Figura 13.** Suspensión de esporas en agua estéril

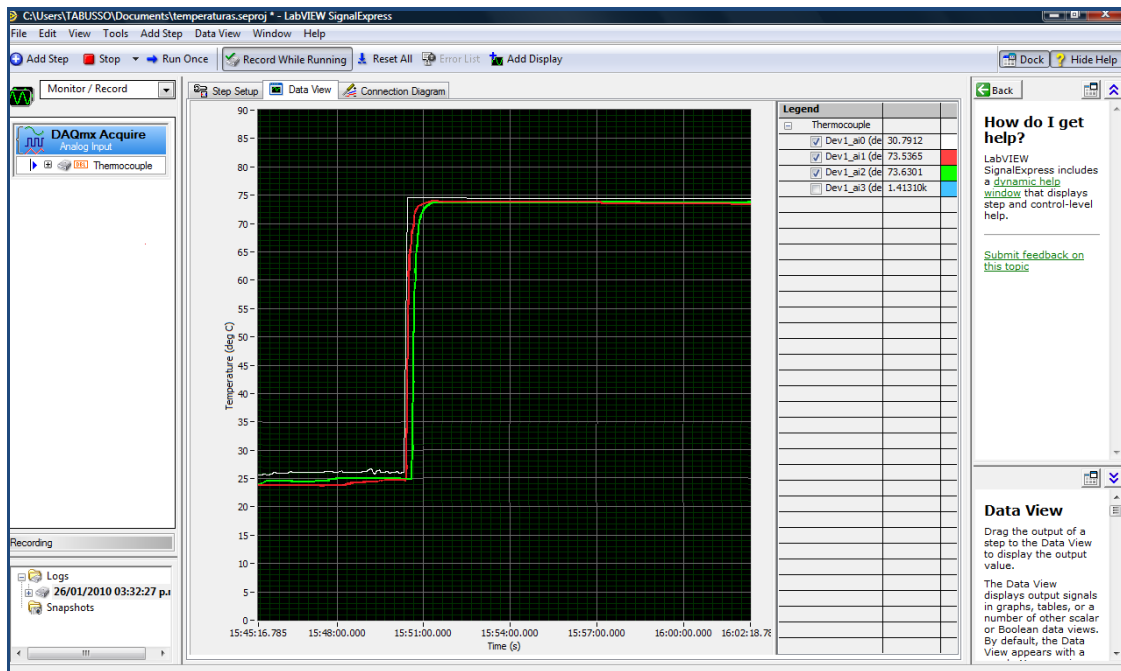
#### **3.4.6 Destrucción de esporas en discos TDT con registro de la temperatura.**

Los discos TDT fueron desinfectados con alcohol 70° y expuestos a luz UV por 30 minutos en la cabina de Bioseguridad JSR - 1200SB. Se tomó 1 mL del inóculo preparado, esporas de *B. subtilis/amyloliquefaciens* y muestras de puré de espárragos, agregándose a los discos TDT, se realizaron tres repeticiones por temperatura. El baño de circulación Brookfield se programó a las temperaturas de trabajo y todos los discos TDT, incluidos los dos que contenían las termocuplas fueron sumergidos al mismo tiempo, registrando el perfil de temperatura completo. Una vez concluido el tiempo establecido se sacaron los discos TDT y se sumergieron inmediatamente en hielo (0 °C) picado. Al término de cada proceso térmico se realizaron las diluciones de acuerdo al tiempo de tratamiento, posteriormente se inocularon por inmersión en agar TGE. Las placas invertidas fueron incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas.



**Figura 14.** Equipos utilizados en el registro de la historia térmica

Para el registro de la temperatura se utilizaron dos discos TDT acoplados con termocuplas tipo T y una termocupla libre para el medio calefactor, además se corroboró la temperatura que indicaba el baño de circulación con un termómetro de mercurio calibrado (Cadent S.A.C.). Los datos ingresados iban siendo guardados y graficados en el programa LabVIEW (Figura 15).



**Figura 15.** Registro de la temperatura mediante el software LabVIEW

### 3.4.7 Procesos térmicos para el desarrollo del método PEIE a temperaturas menores a 100°C

Para el desarrollo del método PEIE (Welt et al, 1997a), se trabajó con tres procesos térmicos, registrando los datos de la historia térmica mediante el software LabVIEW (Figura 15). En la Tabla 5 se presentan las temperaturas de trabajo con sus respectivos tiempos, para este primer ensayo se emplearon temperaturas por debajo de los 100 °C. Utilizando agua destilada como medio calefactor del baño térmico. Los tiempos se establecieron con un intervalo de 10 minutos:

**Tabla 5.** Procesos térmicos: Temperaturas inferiores a 100 °C

	Temperatura °C	Tiempo (minutos)	segundos
<b>Proceso a</b>	<b>95</b>	<b>15</b>	<b>900</b>
<b>Proceso b</b>	<b>90</b>	<b>25</b>	<b>1500</b>
<b>Proceso c</b>	<b>85</b>	<b>35</b>	<b>2100</b>

### 3.4.8 Procesos térmicos para el desarrollo del método PEIE a temperaturas superiores a 100°C

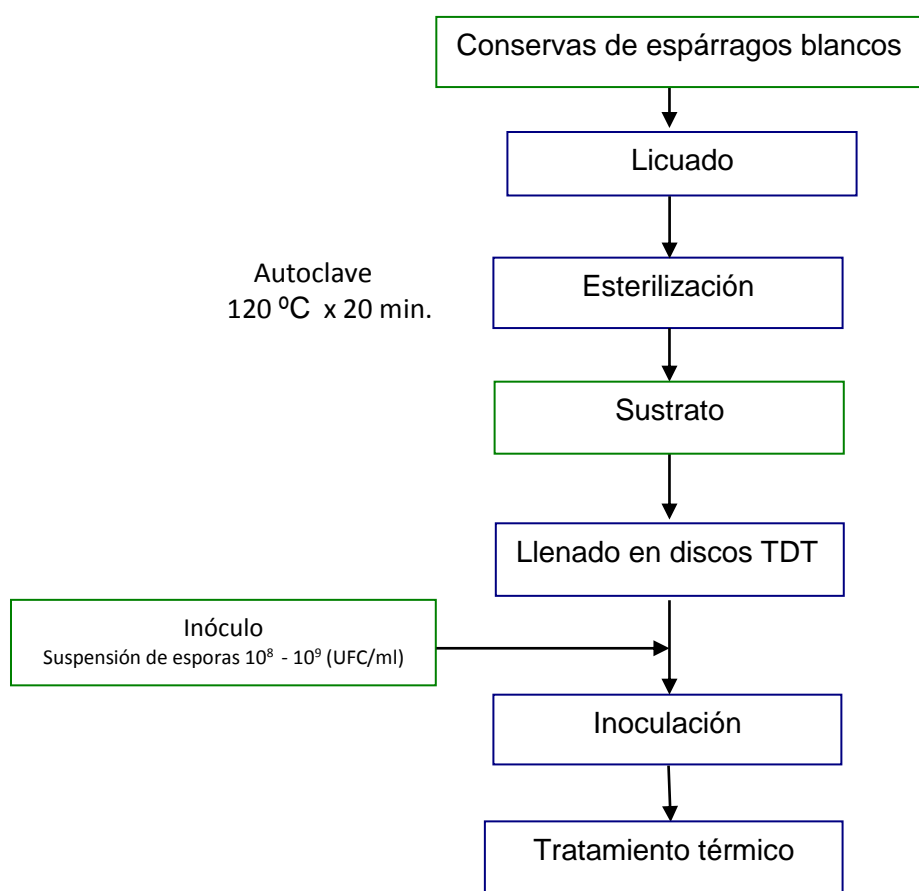
Los procesos térmicos experimentales a temperaturas superiores de 100 °C fueron realizados con tiempos bastante menores en comparación al primer ensayo (Tabla 6), esto debido a que en pruebas preliminares se determinó la resistencia térmica del *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, la cual disminuye en gran medida a temperaturas por encima a los 100°C.

**Tabla 6.** Procesos térmicos: Temperaturas superiores a 100 °C

	Temperatura °C	Tiempo (segundos)
<b>Proceso a</b>	115	90
<b>Proceso b</b>	110	180
<b>Proceso c</b>	100	300

### 3.4.9 Preparación de las muestras para el tratamiento térmico

Los espárragos blancos utilizados fueron: turiones enteros y conservados en salmuera (1.2% de sal) en frascos de vidrio. El pH de las muestras de estas conservas fue en promedio 4.9 disminuyendo aproximadamente 0.2 del valor inicial (pH = 5.18) debido a que las muestras fueron molidas y autoclavadas. A partir de esta operación se procedió a mezclar (utilizando un vortex) 9 mL de lo licuado con 1 mL de inóculo (aproximadamente  $10^8 - 10^9$  ufc/ml de *B. subtilis/amyloliquefaciens*), seguidamente se añadió 1 mL, de la mezcla, a los discos TDT (Figura 14), los cuales herméticamente sellados fueron identificados para someterlos al tratamiento térmico. En las Figuras 16 y 17 se pueden apreciar, de manera secuencial, los pasos seguidos para la evaluación de la destrucción térmica de esporas *B. subtilis/amyloliquefaciens* inoculadas en puré de conservas de espárragos.



**Figura 16.** Preparación de muestras de conservas de espárragos



### 3.4.10 Determinación de Parámetros cinéticos

De los conteos de microorganismos se graficó el Log (UFC/mL) respecto al tiempo correspondiente (t) para las tres repeticiones efectuadas a la misma temperatura. También se realizó un ajuste de función lineal por cada ensayo (cinética de primer orden), obteniéndose una ecuación lineal.

- 1 Preparación del material biológico a utilizar.



- 2 La desinfección de los discos TDT se efectuaron con alcohol 70° y UV por 30 min.

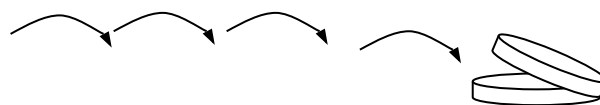


- 3 Se dispensó 1 mL de la muestra inoculada en los discos TDT

- 4 Se preparó el Baño Térmico, con fluido a diferentes temperaturas.



Se realizó las diluciones y sembró en placas con agar TGE (35° C por 48 h).



**Figura 17.** Destrucción de esporas por tratamiento térmico a diferentes temperaturas

Del valor de la pendiente ( $m$ ) de cada función lineal se calculó el valor  $D_T = 1/m$ . Viera et al. (2002) utilizando el método PEIE, plantearon una ligera modificación al aplicar el modelo de Bigelow (1921), determinando valores D equivalentes ( $D_e$ , datos provenientes de las exposiciones térmicas equivalentes del método PEIE). Los valores de tres parámetros  $D_e$  obtenidos de la última iteración se representaron en una gráfica a escala semilogarítmica en función de la temperatura. Mediante una regresión lineal se calculó la ecuación de la recta que rinde los tratamientos de letalidad equivalente, siendo la inversa de la pendiente de dicha recta, el valor del parámetro Z.

$$D_e = - \frac{t_e}{\log(C / C_0)} \quad (10)$$

### 3.5 Desarrollo del Método PEIE en base a los datos experimentales

Para la obtención de parámetros cinéticos utilizando el Método PEIE (Welt et al., 1997a) se diseñó un *Software* con *Microsoft Excel 2007* y *Visual Basic .NET 2010*. El planteamiento de programación se realizó de la siguiente manera:

**Paso 1.** Registro de la historia térmica, datos de temperatura en función del tiempo (mediante el *software labVIEW Signal Express*) fueron transferidos a hojas de cálculo en *Excel 2007*. También se realizó el respectivo recuento de la concentración inicial y final de microorganismos para cada proceso térmico.

**Paso 2.** Como lo indica el método, se eligió un valor aleatorio de  $E_{a1}$  (de preferencia un valor promedio de reportes anteriores) y se estableció su respectiva  $E_{a2} = E_{a1} \times 2$ .

**Paso 3.** Para determinar las respectivas exposiciones isotérmicas equivalentes (EIE's), lo primero en calcular fue el valor de G (Tabla 7), para esto se necesita los datos de temperatura en función del tiempo en la ecuación (6) y el método de integración numérica de Simpson 1/3.

**Tabla 7.** Determinación del valor G

Tiempo <i>s</i>	Temperatura °C	Ecuación en función de t	Integración numérica
0	24.871872	2.47421E-53	
1	25.079002	2.69148E-53	
2	32.694278	5.49016E-52	2.27139E-52
3	42.199767	1.92951E-50	
			4.68149E-49
		Sumatoria	2.5958E-40

$$e^{-\frac{E_{a1}}{R} \left( \frac{1}{T(t)} \right)}$$

$$\frac{1}{3} \cdot (f_{t_1} + 4 \cdot f_{t_2} + f_{t_3})$$

$$G = \int_{t_0}^t e^{\left\{ \frac{-Ea}{R \cdot T(t)} \right\}} dt$$

En la Tabla 7 se observa de manera esquemática la obtención del valor G, Donde  $Ea = (J \cdot mol^{-1})$  y  $R = 8.3145 (J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1})$ . Seguidamente, para cada  $Ea$  ( $E_{a1}$  y  $E_{a2}$ ) se determinaron los valores del tiempo equivalente ( $t_e$ ) y la temperatura equivalente ( $T_e$ ), ambos mediante las ecuaciones (7) y (9) respectivamente. En la Tabla 8 se muestra, a manera de ejemplo, el desarrollo de cada iteración.

**Paso 4.** Se calculó la constante de velocidad isotérmica  $k^T$  (ecuación 11), utilizando los datos de concentración inicial y final del paso 1 y el tiempo equivalente desarrollado en el paso 3.

$$k^T = \frac{-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)}{t_e} \quad (11)$$

**Tabla 8.** Método PEIE (Pares de Exposiciones Isotérmicas Equivalentes) por iteración

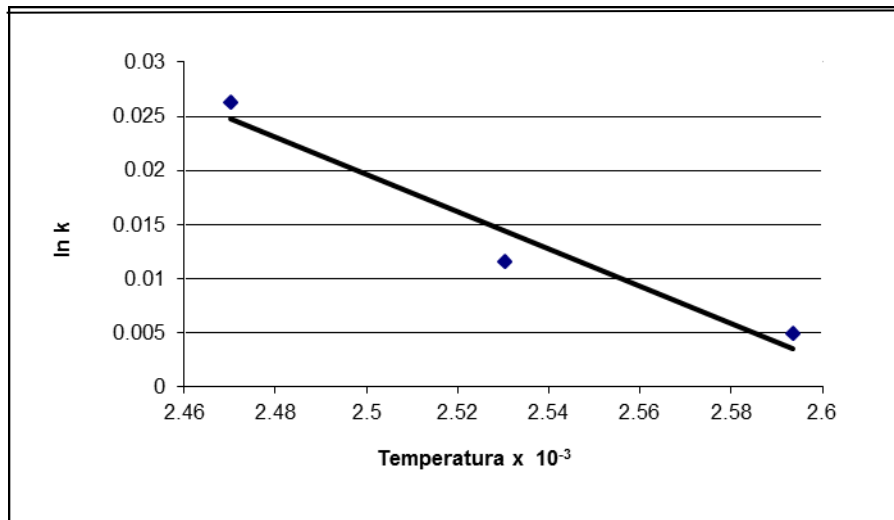
Pares de procesos	Ea (elegidos) (J/mol)	G	Te K	te s	K (1/s)
a	300000	2.5958E-40			
a	600000	7.61973E-83	368.43	884.30	0.01327
b	300000	1.1519E-40			
b	600000	8.95046E-84	363.49	1482.46	0.00570
a	300000	2.5958E-40			
a	600000	7.61973E-83	368.43	884.30	0.01327
c	300000	3.75743E-41			
c	600000	6.77062E-85	358.22	2085.23	0.0025
b	300000	1.1519E-40			
b	600000	8.95046E-84	363.49	1482.46	0.00570
c	300000	3.75743E-41			
c	600000	6.77062E-85	358.22	2085.23	0.0025

**Paso 5.** La energía de activación,  $E_a$ , estimadas para cada iteración, fueron calculadas utilizando los pares de constantes de velocidad isotérmica  $k^T$  y los valores de la temperatura equivalente. La ecuación (12) muestra la obtención de la  $E_a$  para cada par de EIE:

$$E_a = \frac{R \cdot \ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{\left(\frac{T_1 - T_2}{T_1 \cdot T_2}\right)} \quad (12)$$

**Paso 6.** Se regresa al paso 3 y se reemplaza todos los valores de  $E_{a1}$  con los respectivos valores de  $E_a$  estimados en el paso 5. Se repitió este procedimiento hasta que la  $E_{a1}^*$  fuese constante.

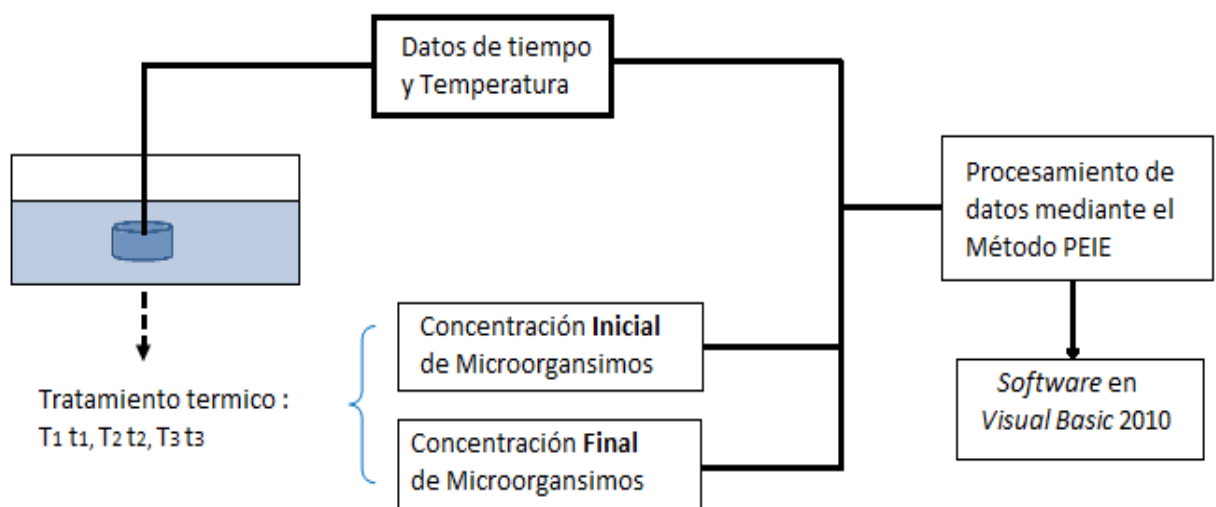
**Paso 7.** Finalmente se creó una gráfica de Arrhenius con los valores  $k^T$  de todas las especificaciones finales de EIE. Los parámetros cinéticos se obtuvieron de un análisis de regresión de todos los puntos de  $k^T$  en el gráfico de Arrhenius (Figura 18).  $10^{-3}$



**Figura 18.** Ejemplo de gráfica de Arrhenius, método PEIE (Welt et al., 1997a)

### 3.5.1 Desarrollo del *Software KineticLab*

El *Software KineticLab* permite determinar parámetros cinéticos de inactivación térmica en base a datos experimentales, para tal fin se utilizó el programa *Microsoft Excel 2007* en una primera etapa y el lenguaje de programación *Microsoft Visual Basic .NET 2010* para el desarrollo final.



**Figura 19.** Esquema general

La metodología seguida para el desarrollo del *software* fue la programación XP (Programación Extrema) la cual se basa en la simplicidad, comunicación y recirculación continua del código. El programa se inició de acuerdo a los requerimientos del método PEIE, para lo cual se fueron creando funciones y módulos secuencialmente (tal como lo indica el método), cada módulo fue diseñado para resolver un paso específico. Así de manera ordenada cada una de las partes contenía funciones y datos íntimamente relacionados semántica y/o funcionalmente (Figura 19).

### **3.5.2 Software *KineticLab***

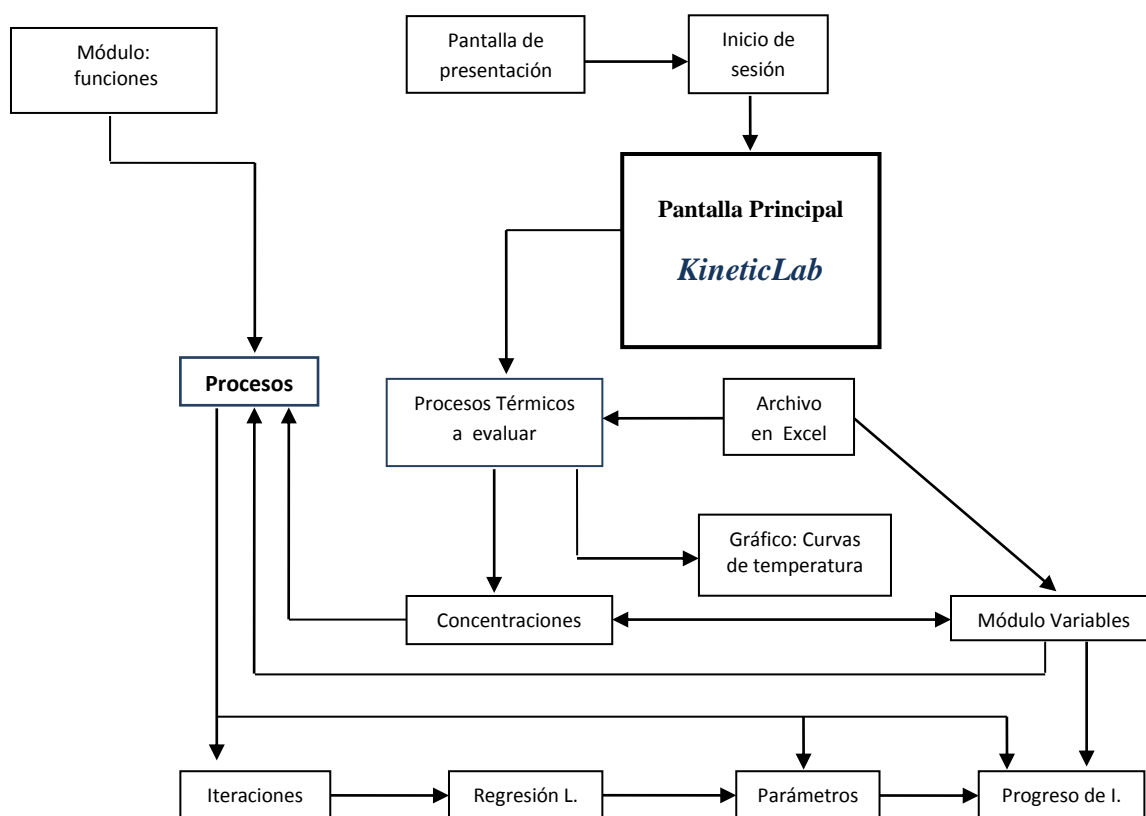
El método PEIE, por sus características secuenciales, es posible desarrollarlo en varias hojas electrónicas de cálculo, siendo los primeros ensayos efectuados en el entorno Microsoft *Excel 2007*, con el fin de comparar resultados y analizar con mayor detalle cada paso que luego serían implementados en el lenguaje de programación *Visual Basic .Net*.

El *software KineticLab* fue creado mediante proyectos en *Visual Studio 2010*, en varias etapas o prototipos previos (Metodología XP). En cada prototipo se fue probando y corrigiendo los errores encontrados. En el primer prototipo se implementaron dos formularios (datos y temperaturas) con los cuales se determinó el valor G para cada uno de los procesos y sus respectivos pares (doce en total) para esto se creó la función “Simpson” (secuencia de fórmulas cuya sumatoria, por el método de integración numérica de Simpson, da el valor G), valores que a su vez, son almacenados en un módulo.

El siguiente prototipo basó su desarrollo en el gráfico que representa las curvas de temperatura vs tiempo. También se consiguieron los valores del tiempo equivalente y temperatura equivalente, así como los primeros valores de K y la energía de activación (datos completos para la primera iteración). El siguiente paso fue implementar un nuevo formulario con controles tipo lista (*ListBox* y *ListView*) donde se podían apreciar los resultados de cada iteración y corroborar con los datos conseguidos en Microsoft office *Excel 2007*, es decir, el prototipo enlazó los diversos formularios para que el programa itere (mediante un bucle) hasta que los resultados de la energía de activación ( $E_a$ ) sean aproximadamente constantes con una precisión de 6 decimales. En el siguiente prototipo se

implementó el desarrollo de ecuaciones lineales (donde los coeficientes fueron hallados con el método de los mínimos cuadrados).

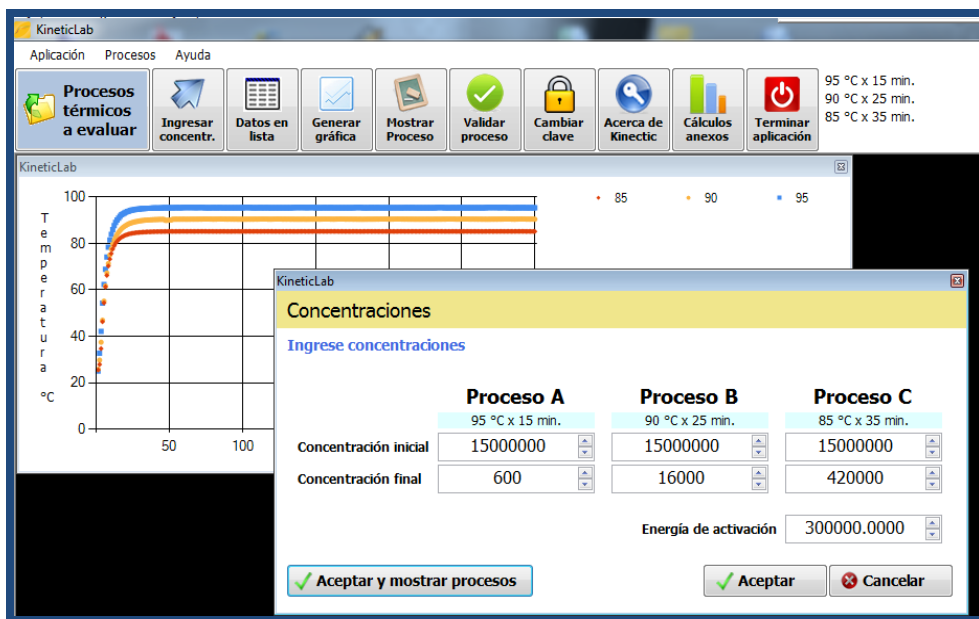
En uno de los últimos prototipos se obtendría una versión beta con los primeros resultados de los parámetros cinéticos mediante la ecuación de Arrhenius, y aunque el programa reportaba resultados muy similares a los hallados en Microsoft office *Excel 2007*, se fundamentaba en sólo dos formularios, lo que representaba dificultades cuando se deseaba observar la continuidad del método. Para subsanar esto, en el proyecto se implementaron diversos procedimientos con el fin de que cada formulario muestre los resultados de manera secuencial. La manera más eficiente de implementar el programa, consistió en descomponer el problema planteado (método PEIE) en *subproblemas* de menor dificultad (programación modular). En la Figura 20 se muestra esquemáticamente el diagrama de funciones, subrutinas y módulos.



**Figura 20.** Diagrama de funciones, sub-rutinas y módulos del programa *KineticLab*

### 3.5.3 Interacción *software KineticLab* - usuario

La interacción del usuario con el *software KineticLab* se encuentra detallada en los Anexos (Manual del usuario) del presente documento. Sin embargo, en esta sección haremos referencia a los procedimientos iniciales para el funcionamiento del *software*, como es el registro de la temperatura, almacenado en un archivo de Excel, datos que el usuario tendrá que enlazarlos al sistema, como se muestra en la Figura 21. Asimismo se tendrán que ingresar los datos de la concentración inicial (antes del tratamiento térmico) y final (después del tratamiento térmico) de microorganismos. A partir de estos datos numéricos el *software* sistemáticamente enlaza funciones matemáticas entre módulos e itera resultados para la estimación final de los parámetros cinéticos.



**Figura 21.** Ingreso de concentración de microorganismos.

Finalmente se creó una pantalla de bienvenida (*splash screen*) la cual se muestra al usuario mientras va cargando la aplicación. Visual Studio .Net proporciona una plantilla de formulario para esta pantalla de bienvenida pre-configurada, la cual se agregó al proyecto. Los diseños gráficos del programa y su ícono se desarrollaron en el *software Adobe® Illustrator CS5.5*.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Recuento de bacterias esporogénicas y porcentaje de esporulación

Muestras de la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* fueron sembradas en agar TGE a 35°C por 48 horas; para el conteo de células totales (sin tratamiento térmico). También se realizó el conteo de células que resistieron al tratamiento térmico de 80°C por 30 minutos, células termorresistentes, cualidad propia de las esporas (Tabla 9). La resistencia a los efectos del calor, irradiación y desecación de células vegetativas y endosporas del mismo organismo varía considerablemente, siendo las endosporas bacterianas las estructuras más resistentes al calor que se conocen (Brown, 2000). Esta resistencia al calor se atribuye al bajo contenido de agua (aproximadamente 15% de hidratación al interior de la spora) y al contenido de ácido dipicolínico, este ácido se combina en forma de quelato con iones  $Ca^{++}$ , localizándose en el protoplasto de las esporas termorresistentes (Brown et al., 1988).

Madigan et al. (2003) manifiestan que a temperaturas altas, casi todas las moléculas pierden su estructura y su función por el proceso denominado desnaturalización, dando como consecuencia la inactivación celular. Montañez y Castro (2006) mencionan que los factores identificados que causan la resistencia al calor por parte de las esporas son: Temperatura de esporulación, protección del ADN por el  $\alpha/\beta$ -type SASP, mineralización y deshidratación del núcleo.

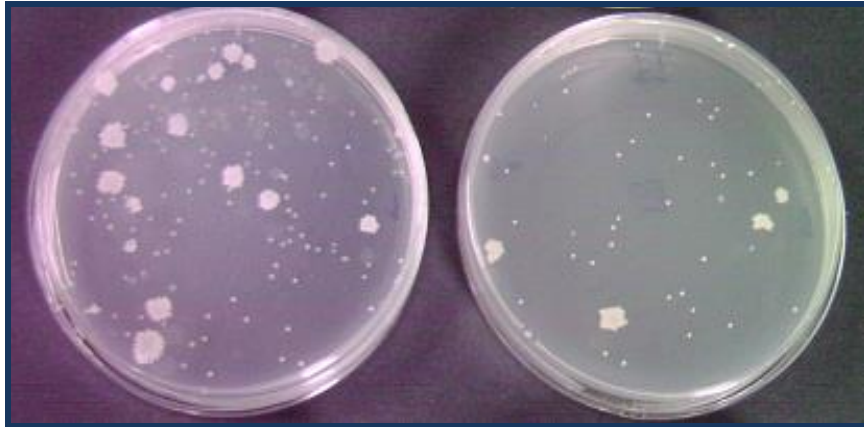
El porcentaje de esporulación del *B. subtilis/amyloliquefaciens* al cabo de 72 horas de incubación fue en promedio de 92.6% (Tabla 9). El medio de esporulación utilizado contenía sales minerales como manganeso, que induce la formación de esporas del género *Bacillus*, del tipo *B. subtilis*, *B. megaterium* (Mah et al., 2008) y *B. coagulans* var. *thermoacidurans* (Roberts y Hitchins, 1969). El proceso de esporulación es muy complejo, requiere de un elevado consumo energético y necesita varias horas para completarse.

Según estudios de Oh y Freese (1976), la mayoría de células de cultivos crecidos en presencia de  $Mn^{++}$  produjeron esporas después de 7 – 8 horas finalizada la fase de crecimiento exponencial. Velezmore et al. (2009) reportaron porcentajes de esporulación superiores al 90% alrededor de las 45 horas, respecto al recuento de células totales para cepas de *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis/amyloliquefaciens*, que se desarrollaron en un medio de esporulación con el mismo medio de cultivo utilizado en la presente investigación.

**Tabla 9.** Recuento de células esporogénicas y porcentaje de esporulación

	<b>Células totales UFC/mL</b>	<b>Log<sub>10</sub> (UFC/mL)</b>	<b>Células esporogénicas UFC/mL</b>	<b>Log<sub>10</sub> (UFC/mL)</b>	<b>Porcentaje de esporulación</b>
Muestras	Suspensión sin tratamiento térmico		Suspensión con tratamiento térmico		%
1	21 x 10 <sup>8</sup>	9.32	50 x 10 <sup>7</sup>	8.70	93.31
2	23 x 10 <sup>8</sup>	9.36	56 x 10 <sup>7</sup>	8.75	93.45
3	32 x 10 <sup>8</sup>	9.51	45 x 10 <sup>7</sup>	8.65	91.04
Promedio	25 x 10 <sup>8</sup>	9.40	50 x 10 <sup>7</sup>	8.70	92.60

En la Figura 22 se observa el crecimiento de cepas *B. subtilis/amyloliquefaciens*. La placa de la izquierda, inoculada con una suspensión de esporas sin tratamiento térmico, muestra mayor población de microorganismos. En contraste, con el mismo factor de dilución la placa del lado derecho presenta, en menor número, el crecimiento de células que resistieron al tratamiento de 80°C por 30 minutos. Como ya se indicó, la termorresistencia es una de las características principales de las endosporas. Raisman (2008) menciona que mientras las bacterias o formas vegetativas de las bacterias esporuladoras sometidas a 80 °C durante diez minutos (pasteurización) mueren, las endosporas sobreviven e incluso soportan un calentamiento superior y para eliminarlas son necesarias técnicas de esterilización.



**Figura 22.** Izq. suspensión de esporas sin tratamiento térmico. Der. suspensión de esporas con tratamiento térmico

#### **4.2 Desarrollo del método PEIE y del *software KineticLab***

El método PEIE fue probado con todos los datos de la historia térmica (tiempo-temperatura) de tres procesos térmicos, muestras de puré de conservas de espárragos y esporas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. Este método fue creado y empleado para entender el comportamiento de reacciones de primer orden, como es la inactivación térmica de una población de microorganismos en un determinado producto y sujeto a condiciones específicas (Welt et al., 1997b). Debido a su diseño secuencial permite una sistematización lógica, lo cual ha servido a diferentes líneas de investigación cuyo objetivo fue evaluar la cinética de inactivación o degradación de algún componente, siempre en reacciones de primer orden, lo que hace posible su acondicionamiento en diversos lenguajes de programación.

El *software KineticLab*, es un programa ejecutable creado en base al método PEIE, fue desarrollado en Visual Studio .Net 2010, y no requiere del conocimiento previo de este entorno para su uso. Los programadores indican que uno de los objetivos en el desarrollo de un *software* es la practicidad, permitiendo al usuario una fácil comprensión e interacción. Así mismo mencionan que el objetivo principal de todo *software* es cumplir con los requerimientos planteados por el usuario. En el caso de *KineticLab*, el programa fue diseñado para estimar parámetros cinéticos a partir de datos experimentales. Sommerville (2002) define al diseño de un *software* como “una abstracción de un proceso real”.

Se utilizó Visual Studio .Net 2010 debido a ser un programa orientado a objetos, poseer múltiples herramientas para agilizar el desarrollo de un *software* (herramientas de gestión y control de errores, herramientas de prueba), facilitar un modelo de procesos, trabajar con diversos orígenes de datos y crear aplicaciones móviles o basadas en la nube. No obstante la principal limitación que presenta Visual Studio es no ser multiplataforma (es decir, solamente funciona en el entorno *Windows* y no en Linux o MAC), también requiere recursos aceptables de *hardware* para que pueda funcionar de forma rápida; sin embargo, los equipos de última generación poseen procesadores de un mínimo de 2 GB de RAM, con lo cual se supera este inconveniente.

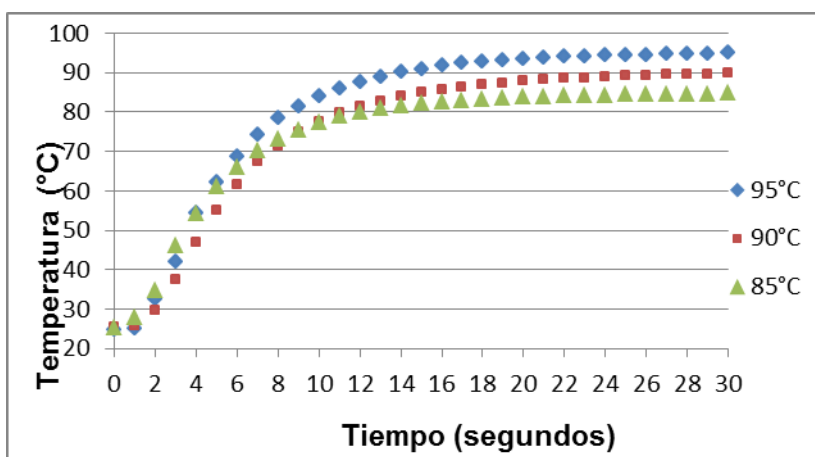
Vieira et al. (2001) crearon el programa “*Kinprm*” (desarrollado con el lenguaje de programación FORTRAN), en el cual se aplica el método PEIE para evaluar la degradación del ácido ascórbico en néctar de Cupuaçu. Así también Moody (2003) desarrolló un algoritmo con el *software* comercial Mathcad versión 8.0, ejecutando los pasos del método PEIE para calcular la cinética de inactivación de *Escherichia coli* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo de naranja. En ambas investigaciones se utilizaron intercambiadores de calor a escala, siendo obtenidos los valores  $D$  y  $z$ .

#### **4.2.1 KineticLab utilizando temperaturas inferiores a 100 °C**

Para este ensayo se emplearon: esporas de *B. subtilis/amyloliquefaciens*, temperaturas inferiores a los 100°C y muestras de conservas de espárragos blancos (pH = 4.9). El pH de las muestras inoculadas tiene gran influencia en la termorresistencia de las bacterias. Según diversos investigadores los microorganismos del género *Bacillus* muestran su máximo valor de termorresistencia a pH neutro. (Velezmoro et al., 2009) reportaron que la disminución del pH 7 a 4 en un medio de suspensión de esporas *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* disminuyó la termorresistencia (valores  $D_t$ ) de esta cepa.

Los procesos térmicos utilizados fueron: a) 95°C x 15 min, b) 90°C x 25 min y c) 85°C x 35 min, los registros de historia térmica (Figura 23) se obtuvieron mediante termocuplas tipo T acopladas al interior de los discos TDT, estos datos llegaron a la temperatura de trabajo en pocos segundos como se puede apreciar en el Anexo II. Respecto a los tiempos de llegada a la temperatura de trabajo, Jin et al. (2007) manifiestan que el empleo de discos

TDT permite un calentamiento más rápido y uniforme que el método de los capilares de vidrio, esto se explica por la existencia de una mayor proporción de superficie (aspectos de diámetro / altura) en contacto, además de las propiedades de conductividad térmica del aluminio ( $180 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).



**Figura 23.** Historia térmica (temperaturas inferiores a 100 °C)

En los discos TDT, el tiempo que demora la muestra en alcanzar la temperatura de trabajo depende de la naturaleza de la misma (Jin et al, 2007 y Chung et al, 2007), otro factor que influye es el medio calefactor del baño térmico. Velezmoro et al. (2009) reportaron que para temperaturas inferiores a 100 °C (con agua destilada como medio calefactor) los tiempos de llegada a la temperatura de trabajo fueron: a 85°C en 23 s, 90°C en 22 s. y 95°C en 22 s. Al realizar las pruebas con el fluido thermal H2OS Julabo en similares condiciones, los tiempos fueron: 128, 121 y 124 segundos respectivamente, lo que denota mayor tiempo de llegada a una misma temperatura de trabajo. Como se aprecia, el fluido utilizado como medio calefactor determinó, en gran medida, la cantidad de datos que posteriormente se ingresarán al *software KineticLab*.

Los tiempos de llegada a la temperatura de trabajo para los discos TDT llenados con puré de espárragos (Tabla 10), fueron superiores a los reportados cuando los discos estaban con agua destilada, lo cual se debería a la composición semisólida de las muestras de espárragos, para el caso de la temperatura a 85°C, el tiempo de llegada fue de 26 segundos en tanto que para agua destilada fue de 23 segundos. Ensayos de Chung et al. (2007) demostraron que los discos TDT conteniendo puré de papas llegaron a 121°C luego de 60 s de calentamiento. Jin et al. (2007) sometieron muestras de clara de huevo en discos TDT,

estas alcanzaron la temperatura programada después de 45 s, lo cual fue 25 s más rápido que el método del tubo de vidrio. Al ser más rápido el calentamiento de las muestras el tiempo CUT se acorta, lo que dará una mayor precisión en la obtención de datos de cinética térmica (Jin et al, 2007).

**Tabla 10.** Tiempo de llegada a las temperaturas de trabajo (inferiores a 100 °C) del puré de espárragos, cuando el medio calefactor fue agua destilada.

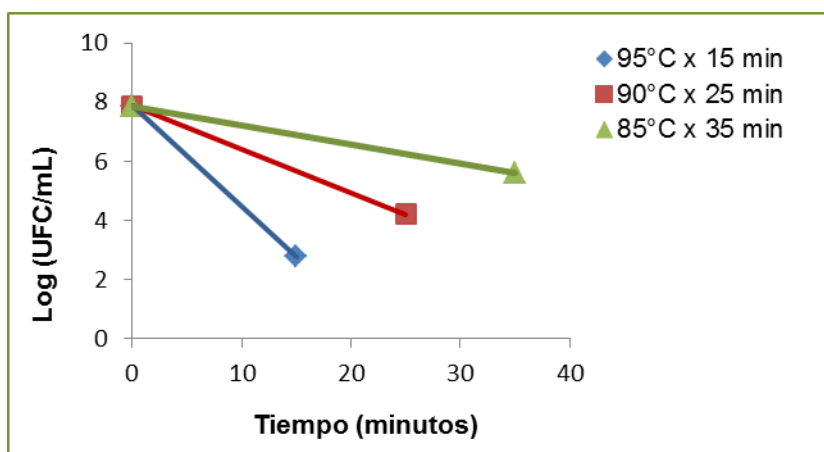
Procesos	Temperatura de proceso (°C)	Tiempo de llegada (segundos)
a	95	27
b	90	28
c	85	26

El empleo de discos TDT ha sido reportado por diversos autores como un instrumento útil en investigaciones de termorresistencia de microorganismos inoculados en alimentos, por ejemplo: Jin et al. (2007) investigaron la resistencia de la *Salmonella enteritis* y *Escherichia coli K12* en muestras de clara de huevo, Chung et al. (2007) determinaron la resistencia térmica del *Clostridium sporogenes* PA 3679 en puré de papa y Yuk et al. (2009) estudiaron la resistencia al calor del *Escherichia coli K12* en cidra de manzana. Los resultados de los estudios mencionados fueron hallados con métodos isotérmicos y demuestran los beneficios de estos equipos.

La Tabla 11 presenta el conteo de microorganismos antes y después de los respectivos tratamientos térmicos. Se observa que a mayor temperatura de exposición el número de microorganismos es menor, de manera independiente del tiempo. A 95°C, las esporas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* registraron en promedio valores de  $52 \times 10^6$  UFC/mL (en el tiempo cero) que fueron descendiendo en cinco ciclos logarítmicos en los 15 minutos de exposición ( $42 \times 10$  UFC/mL). En el caso del tratamiento a 90°C, las esporas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* registraron una disminución moderada desde  $52 \times 10^6$  UFC/mL en el tiempo cero a  $26 \times 10^3$  UFC/mL a los 25 minutos. A 85°C, las esporas registraron una lenta disminución de dos ciclos logarítmicos, después de los 35 minutos de calentamiento. La tendencia se observa en la Figura 24.

**Tabla 11.** Datos experimentales de resistencia térmica de esporas *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (Temperaturas inferiores a 100°C)

	Temperatura y tiempo de exposición al tratamiento térmico			
Muestras	0 min	85°C x 35 min	90°C x 25 min	95°C x 15 min
1	75 x 10 <sup>6</sup>	42 x 10 <sup>4</sup>	16 x 10 <sup>3</sup>	60 x 10
2	18 x 10 <sup>6</sup>	12 x 10 <sup>4</sup>	13 x 10 <sup>3</sup>	11 x 10
3	62 x 10 <sup>6</sup>	31 x 10 <sup>4</sup>	48 x 10 <sup>3</sup>	54 x 10
<b>Promedio</b>	<b>52 x 10<sup>6</sup></b>	<b>28 x 10<sup>4</sup></b>	<b>26 x 10<sup>3</sup></b>	<b>42 x 10</b>



**Figura 24.** Resistencia térmica de las esporas de *Bacillus subtilis / amyloliquefaciens* a temperaturas menores de 100 °C (promedio de tres repeticiones).

Con los datos de historia térmica y conteo de microorganismos reportados, se dio inicio al desarrollo del método PEIE: Como primer paso se asignó un valor para la Energía de activación ( $Ea_1$ ). La elección de este valor inicial ( $Ea_1$ ) es fundamental para el progreso de las iteraciones. Welt et al. (1997a) indican que si bien éste puede ser elegido arbitrariamente, un valor coherente de  $Ea$  hace que las exposiciones isotérmicas equivalentes (EIE) converjan mejor en la correspondiente curva de Arrhenius. En la Tabla 12 se observan los valores de  $Ea_1 = 300$  kJ/mol y  $Ea_2 = 600$  kJ/mol ( $2 \times Ea_1$ ), datos iniciales para el desarrollo del método. Welt et al. (1997a) realizaron varias alternativas para la elección de la  $Ea_2$ , como múltiplos, submúltiplos y otras cantidades, los resultados

demonstraron, mediante la SQQ (suma de residuales al cuadrado), que eran muy próximos. Indicándose, por su practicidad al doble de la  $Ea_1$  como el más idóneo para la obtención de parámetros cinéticos.

En las Tablas 12, 13 y 14 se aprecia de manera secuencial el progreso de las tres primeras iteraciones, para los datos de la muestra 1. Los primeros resultados en obtenerse fueron los valores  $G$ , mostrados en la tercera columna, los cuales son hallados a partir de la integración de la ecuación 6 y mediante integración numérica usando el método de Simpson 1/3. Swartzel (1982) estableció la denominación del valor  $G$  en el desarrollo del método del punto equivalente (EPM), el cual postula que en un calentamiento continuo, dependiendo de diferentes datos de energía de activación, todas las líneas producidas mediante las ecuaciones respectivas tienen un solo punto de intersección (denominado punto equivalente), punto del cual se pueden obtener el tiempo ( $t_e$ ) y la temperatura equivalente ( $T_e$ ), lo que también se denomina como una exposición isotérmica equivalente (EIE). Sin embargo, investigaciones posteriores verificaron que no todas las rectas coincidían en un solo punto (Maesmans et al., 1995 y Welt et al., 1997a), por lo que se desarrollaron nuevos métodos, como el llamado método de intersección lineal (LI) propuesto por Kyereme et al. (1999) o el método PEIE (Welt et al., 1997a), ambos toman como base el valioso aporte de Swartzel. En el caso del método PEIE, que es iterativo por naturaleza, las EIE's se producen al final de cada iteración y los datos de  $t_e$  y  $T_e$  se hallan al desarrollar simultáneamente las ecuaciones 9a y 9b. Welt et al. (1997a) indican que para una historia térmica dada,  $T(t)$ , se produce un valor distinto de  $G$ , debido a que está en función de la  $Ea$ , como se observa en el progreso de las iteraciones (Tabla 12, 13 y 14).

Swartzel (1982) menciona que, de manera similar al método del valor  $F_0$ , el tiempo  $t_e$ , a temperatura  $T_e$ , comprende una exposición isotérmica equivalente que proporciona el mismo grado de reacción (letalidad) que un proceso térmico dinámico (Figura 25).



**Tabla 12.** Primera iteración (temperaturas inferiores a 100°C)

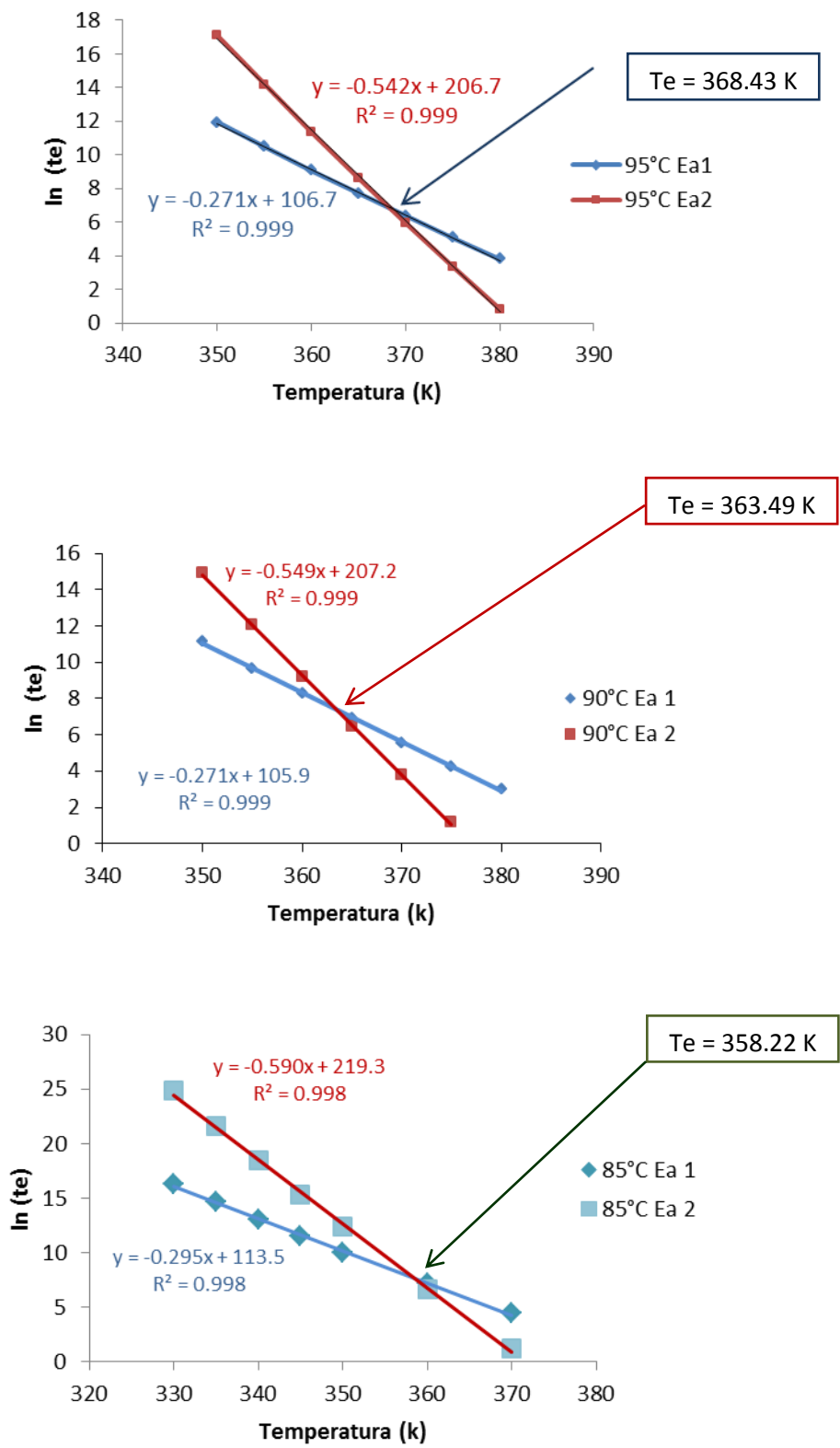
Pares de procesos	Ea (elegidas) (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea estimado (kJ/mol)
A	300000	2.5958E-40				
A	600000	7.61973E-83	368.43	884.30	0.01327	
B	300000	1.1519E-40				
B	600000	8.95046E-84	363.49	1482.46	0.00570	<b>190.689</b>
A	300000	2.5958E-40				
A	600000	7.61973E-83	368.43	884.30	0.01327	
C	300000	3.75743E-41				
C	600000	6.77062E-85	358.22	2085.23	0.0025	<b>180.042</b>
B	300000	1.1519E-40				
B	600000	8.95046E-84	363.49	1482.46	0.00570	
C	300000	3.75743E-41				
C	600000	6.77062E-85	358.22	2085.23	0.0025	<b>170.358</b>

**Tabla 13.** Segunda iteración

Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea estimado (kJ/mol)
A	190689	8.17063E-25				
A	381379	7.52787E-52	368.42	886.83	0.01323	
B	190689	5.88248E-25				
B	381379	2.32957E-52	363.49	1485.40	0.00569	<b>190.603</b>
A	180042	2.64203E-23				
A	360083	7.8684E-49	368.42	887.13	0.01323	
C	180042	1.16622E-23				
C	360083	6.51416E-50	358.21	2087.88	0.0025	<b>179.947</b>
B	170358	4.91285E-22				
B	340715	1.62413E-46	363.48	1486.09	0.00569	
C	170358	3.01214E-22				
C	340715	4.34498E-47	358.21	2088.15	0.0025	<b>170.257</b>

**Tabla 14.** Tercera iteración

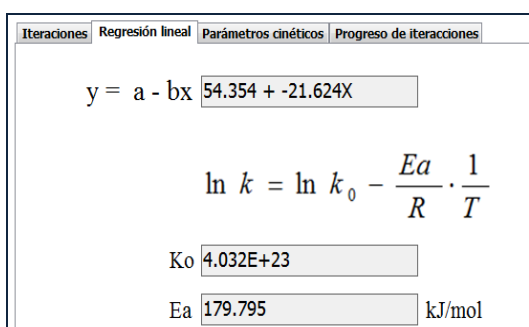
Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea estimado (kJ/mol)
A	190603	8.40334E-25				
A	381207	7.96278E-52	368.42	886.83	0.01323	
B	190603	6.05233E-25				
B	381207	2.46604E-52	363.49	1485.41	0.00569	<b>190.603</b>
A	179947	2.72455E-23				
A	359895	8.36756E-49	368.42	887.13	0.01323	
C	179947	1.2037E-23				
C	359895	6.93956E-50	358.21	2087.88	0.0025	<b>179.947</b>
B	170257	5.08005E-22				
B	340513	1.73656E-46	363.48	1486.10	0.00569	
C	170257	3.11618E-22				
C	340513	4.65032E-47	358.21	2088.15	0.0025	<b>170.256</b>



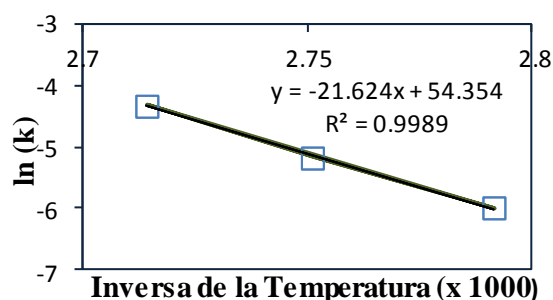
**Figura 25.** Representación de los tres procesos isotérmicos equivalentes de la primera iteración del método PEIE

Resolviendo simultáneamente las ecuaciones (9a) se obtuvieron los puntos de coincidencia, y por ende; la temperatura equivalente ( $T_e$ ) y el tiempo equivalente ( $t_e$ ). Como se mencionó en anteriores líneas, a estos puntos de intersección se denominaron Exposiciones Isotérmicas Equivalentes (EIEs), gráficamente se pueden obtener en la intersección de las dos rectas (Figura 25).

A partir de las exposiciones isotérmicas equivalentes iniciales se realizaron las iteraciones hasta determinar que las energías de activación ( $E_a$ , valores estimados) fueran constantes, con una aproximación de  $10^{-6}$  respecto al valor anterior (Tabla 12, 13 y 14). Una vez que las energías de activación estimadas son casi exactas, se procedió a tomar los datos de  $k^T$  (constante de velocidad isotérmica) y temperatura equivalente,  $T_e$ , creando una gráfica  $1/T_e$  vs  $\ln k^T$  (Figura 26b). La ecuación de la recta resultante se equiparó con la ecuación de Arrhenius, tal como se muestra en la Figura 26a.



**Figura 26a.** Presentación de resultados: Regresión lineal *Software KineticLab*.

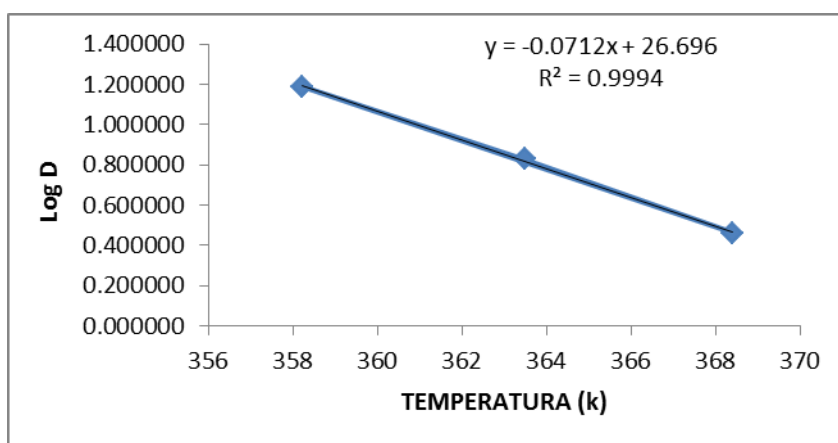


**Figura 26 b.** Gráfica de Arrhenius, con datos de la última iteración.

Cada iteración del método PEIE consiste en el cálculo de energía de activación a partir de estimaciones de pares de procesos isotérmicos equivalentes. Por lo tanto, el método se acerca en la parte final a un enfoque isotérmico tradicional (Welt et al., 1997a). En el caso de la curva de supervivencia, el método PEIE, solo emplea dos puntos (concentración inicial y final de microorganismos), por lo cual en ausencia de más datos, los resultados se vuelven muy próximos a los del método tradicional. Sin embargo, es importante mencionar que el método PEIE trabaja con todo el rango temperatura en función al tiempo e itera resultados para una mejor aproximación.

Los parámetros cinéticos encontrados para las esporas de *Bacillus subtilis/ amyloliquefaciens* en puré de conservas de espárragos, utilizando el método PEIE y con procesos a temperaturas menores a los 100°C fueron de  $E_a = 179.795$  kJ/mol y  $k_0 = 4.032E+23$  min<sup>-1</sup>. Gómez – Sánchez, et al. (2007) reportaron valores de 220 a 274 kJ/mol para *B. subtilis* en medio buffer pH 7, los mismos autores reportan una  $E_a$  de 283 kJ/mol para el *Bacillus stearothermophilus*.

Con los datos obtenidos de  $k$  y su correspondiente  $T_e$  de la última iteración se realizó un análisis de regresión lineal, para la obtención de valores  $D_e$  (Figura 27). Estos valores fueron comparados en Excel y el software *KineticLab*, hallándose resultados muy similares, variando únicamente en centésimas, lo cual se debería al tipo de datos asignados a la temperatura (datos *double*) en Visual Basic Net.



**Figura 27.** Determinación de valores  $D$

La Tabla 15 muestra los valores  $D$  obtenidos para los tres procesos térmicos (temperaturas inferiores a 100°C). Se puede notar que a mayor temperatura, la termorresistencia de las esporas descende. Como se indicó anteriormente, un aspecto importante en la termorresistencia de las esporas bacterianas es el pH del medio. Al respecto Palop et al. (1996) en un estudio isotérmico con puré de espárragos a pH 4 determinó el valor  $D_{93^{\circ}C} = 0.45$  minutos para cepas de *Bacillus subtilis* CECT4522, demostrando la influencia de la acidez en la resistencia térmica de las bacterias. El dato más cercano a comparar es el  $D_{95^{\circ}C} = 3.24$  minutos, que difiere en dos aspectos importantes: la temperatura, mayor en dos grados centígrados y el pH de la muestra utilizada (puré de espárragos blancos, pH = 4.9), este segundo aspecto es clave en la termorresistencia de esporas bacterianas, así lo demuestran diversas publicaciones, por ejemplo los investigadores Montville y Sapers

(1981) que determinaron a un pH de 4.4 el valor  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 4.5$  minutos para esporas de *Bacillus licheniformis* que fueron asiladas de conservas de tomates enlatados, en el estudio se aumentó el pH del medio y se determinó que la termorresistencia de esta cepa también se elevó.

**Tabla 15.** Determinación de valores  $D$  (min) método PEIE

	$D_{85^{\circ}\text{C}}$	$D_{90^{\circ}\text{C}}$	$D_{95^{\circ}\text{C}}$
1° repetición	16.19	7.14	3.14
2° repetición	17.61	7.56	3.24
3° repetición	16.74	7.49	3.35
<b>Promedio</b>	<b>16.85</b>	<b>7.39</b>	<b>3.24</b>
DESV ST	0.67	0.24	0.12

Vieira et al. (2002) aplicando el método PEIE y el modelo de Bigelow obtienen mediante un análisis de regresión el valor  $D_{95} = 5.5 \pm 1.2$  min, trabajando con esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculadas en néctar de Cupuaçu. Este valor relativamente alto, explican los investigadores, se interpreta como consecuencia de no tomar en cuenta la resistencia térmica añadida que aporta el tiempo de congelamiento de las muestras.

La Figura 28 muestra el progreso de las iteraciones calculadas por el programa, se puede apreciar un valor de SSQ del error de  $10^{-7}$ , sin embargo, cuando las iteraciones se detienen y las energías de activación estimadas son casi exactas, respecto a la iteración anterior, los resultados no son tan próximos a los valores de las concentraciones exactas ( $C/C_0$  real) a diferencia de lo reportado por Welt et al. (1997a) donde los datos convergen según se avanzan en las iteraciones. Cabe mencionar que para la demostración inicial del método PEIE los investigadores utilizaron un incremento de la temperatura simulado, una ecuación lineal, mientras que en el desarrollo de la presente investigación se utilizó todo el rango del incremento de la temperatura reportado por las termocuplas.

Iteraciones	Regresión lineal	Parámetros cinéticos	Progreso de iteraciones				
Predicción de iteraciones							
			1	2	3	4	5
ko			4.152990E+0...	4.032035E+0...	4.031951E+0...	4.031951E+0...	4.031951E+0...
Ea			179.881425	179.795161	179.795100	179.795099	179.795099
Procesos	C/Co real	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	
a	0.000008	0.000009	0.000010	0.000010	0.000010	0.000010	
b	0.000213	0.000161	0.000163	0.000163	0.000163	0.000163	
c	0.005600	0.006026	0.006044	0.006044	0.006044	0.006044	
	SSQ Error	1.84181E-07	1.9964E-07	1.9964E-07	1.9964E-07	1.9964E-07	

**Figura 28.** Progreso de iteraciones, software *KineticLab*

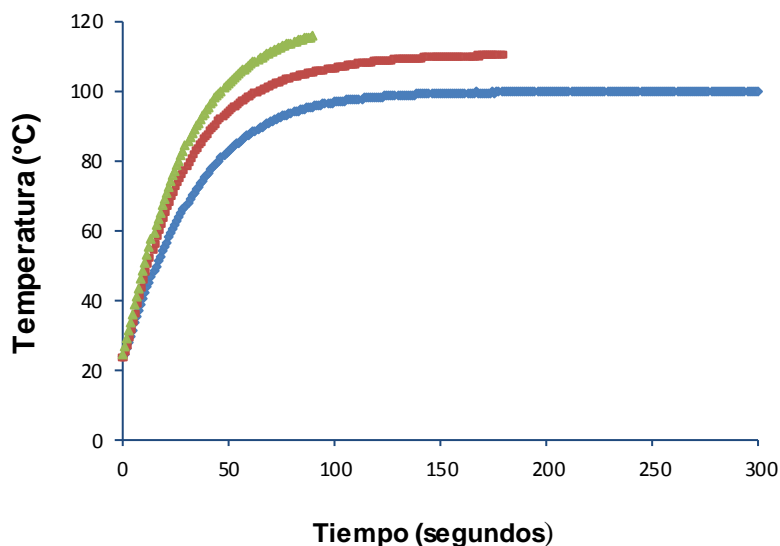
#### 4.2.2 *KineticLab* utilizando temperaturas superiores a 100 °C

Los procesos experimentales utilizando temperaturas superiores a 100 °C fueron planteados de la siguiente manera: **a)** 120°C x 90 segundos, **b)** 110°C x 3 min y **c)** 100°C x 5 min. Es importante indicar que en el primer proceso; programado a 120°C por 90 segundos no se llegó a dicha temperatura, siendo la temperatura máxima alcanzada a los 90 segundos de 115.7 °C, esto debido a las características de transferencia de calor del fluido Thermal H2OS Julabo, fluido utilizado como medio calefactor en lugar del agua destilada.

El tiempo necesario para que las muestras alcancen la temperatura programada al 99 % estuvo entre los 127 y 138 s (Tabla 16). Jin et al. (2007) y Chung et al. (2007) indican que este tiempo depende de la naturaleza de la muestra y del medio calefactor. Un aspecto sustancial en la presente investigación y por tanto que influyó en los resultados del método PEIE, es el tiempo de llegada a la temperatura de trabajo, puesto que con el fluido Thermal H2OS Julabo (como medio calefactor) y las muestras de espárragos blancos al interior de los discos, éste tiempo fue variado. Welt et al. (1997a) utilizaron ecuaciones lineal para la variación de la temperatura en la demostración del método PEIE. En la presente investigación se propuso utilizar valores reales de temperatura (obtenidos directamente de los sensores), estos datos no se ajustan necesariamente a una ecuación lineal, sino que muestran una curva inicial (de incremento de temperatura) para luego estabilizarse en una línea recta (Figura 29), según el número de datos y la temperatura requerida.

**Tabla 16.** Tiempos de llegada a la temperatura de trabajo (superior a 100°C) del puré de espárragos, cuando el medio calefactor fue fluido térmico.

Temperatura de proceso °C	Tiempo de llegada (segundos)
120	127
110	133
100	138

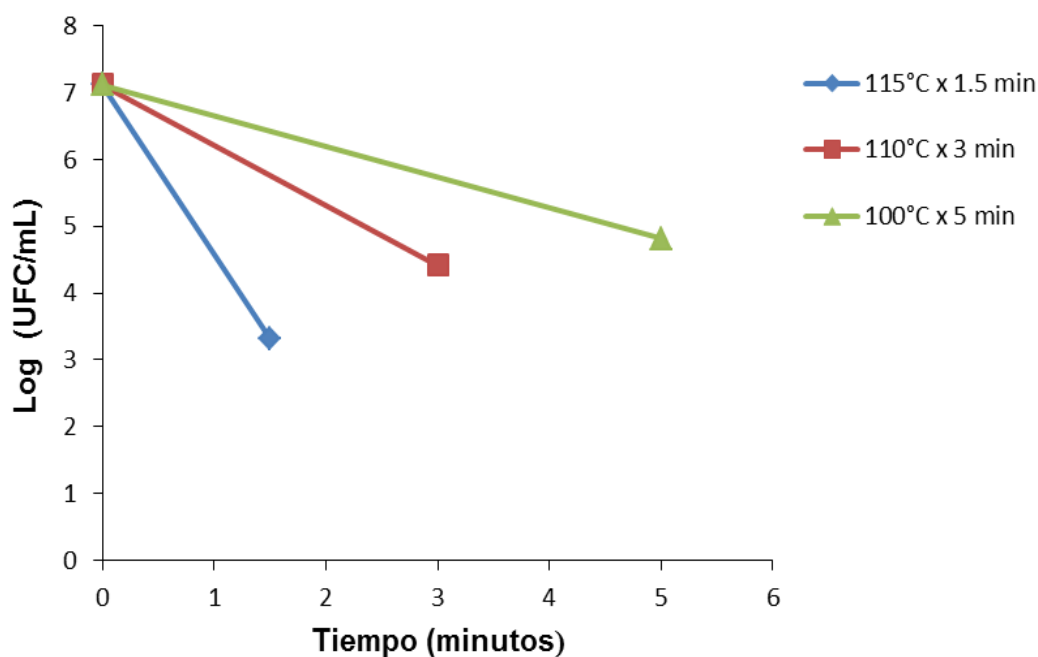


**Figura 29.** Historias térmicas (temperaturas superiores a 100 °C)

La Tabla 17 muestra el conteo de microorganismos formadores de esporas *B. subtilis/amyloliquefaciens* en procesos térmicos superiores a 100°C. Se registraron valores promedio de  $42 \times 10^6$  UFC/ml al tiempo cero de exposición. Se observa una disminución de tres ciclos logarítmicos a 100°C por 5 minutos, a 110°C por 3 minutos la reducción es de cuatro ciclos logarítmicos. Dándose el caso; que a mayor temperatura de exposición mayor inactivación de microorganismos. En el último proceso (de 120°C) la población de esporas decae cinco ciclos logarítmicos (Figura 30).

**Tabla 17.** Procesos térmicos de 100, 110 y 120°C con esporas de *B. subtilis/amyloliquefaciens* y conservas de espárragos

Muestras	Temperatura y Tiempo de exposición al tratamiento térmico			
	0 min	100°C x 5 min	110°C x 3 min	120°C x 1.5 min
1	15 x 10 <sup>6</sup>	35 x 10 <sup>3</sup>	24 x 10 <sup>2</sup>	26 x 10
2	96 x 10 <sup>6</sup>	43 x 10 <sup>3</sup>	31 x 10 <sup>2</sup>	12 x 10
3	16 x 10 <sup>6</sup>	66 x 10 <sup>3</sup>	81 x 10 <sup>2</sup>	28 x 10
<b>Promedio</b>	<b>42 x 10<sup>6</sup></b>	<b>48 x 10<sup>3</sup></b>	<b>45 x 10<sup>2</sup></b>	<b>22 x 10</b>

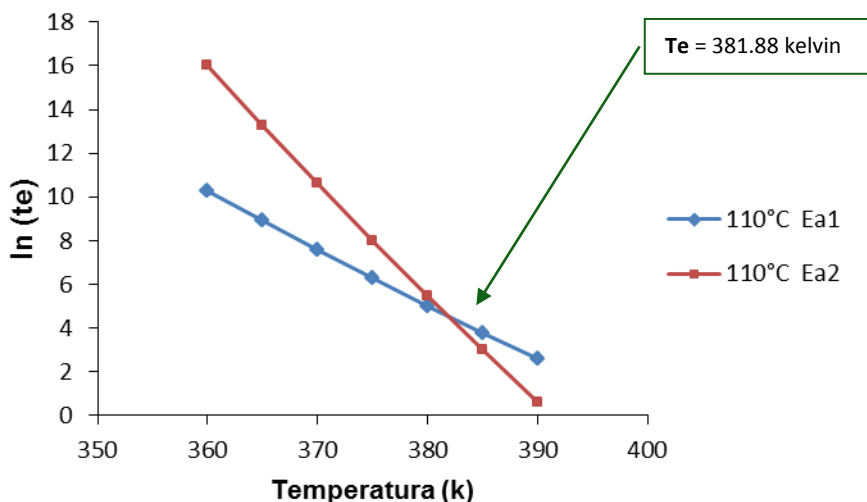
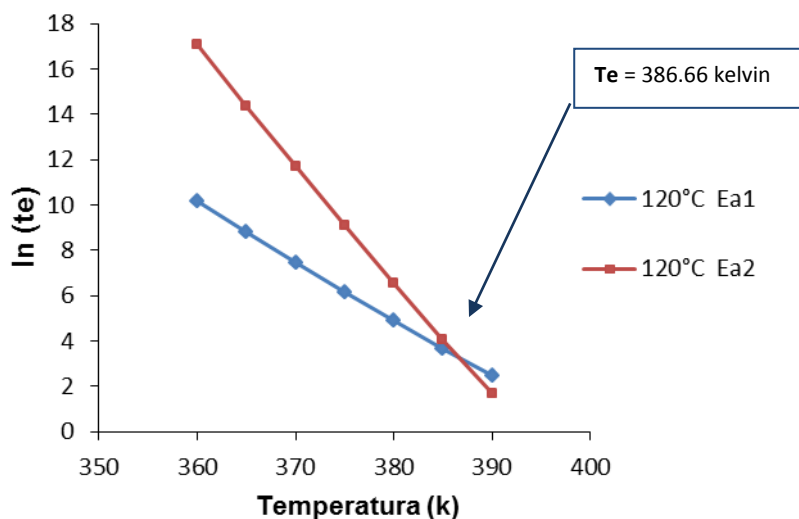


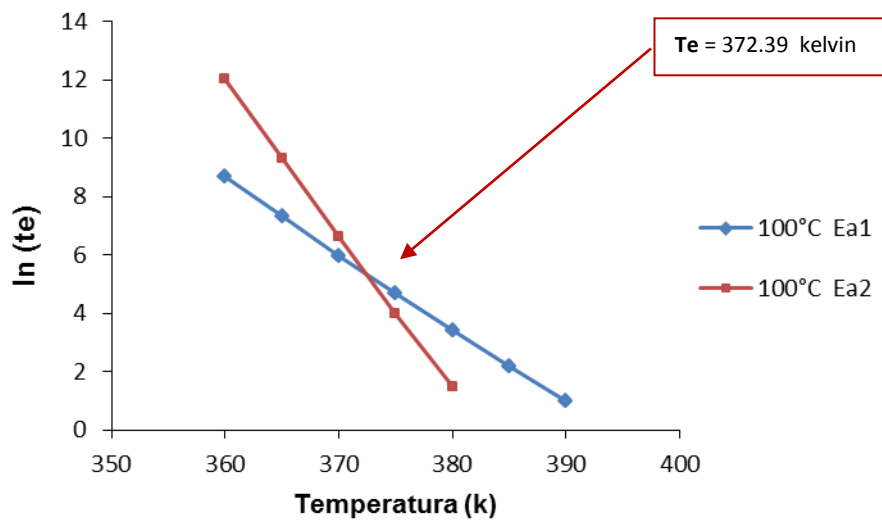
**Figura 30.** Resistencia térmica de esporas de *B. subtilis/amyloliquefaciens* en tres procesos térmicos (temperaturas superiores a 100 °C)

En el desarrollo del método PEIE, para temperaturas superiores a 100°C, se utilizó como valor inicial de la  $E_a = 300000 \text{ J/mol}$  (igual que para el primer ensayo), también fueron probadas otras cifras, comprobándose con el software *KineticLab*, que el valor inicial de  $E_a$  puede ser un valor arbitrario. Sin embargo, el número de iteraciones sí varía en función de los diferentes valores de  $E_a$  probados.



El método PEIE genera un conjunto de parámetros cinéticos para cada par de experimentos no isotérmicos (Welt et al., 1997b) que, al final de las iteraciones, se acercan a un enfoque isotérmico, esto es equivalente a realizar una línea a través de cada par de puntos trazados a partir de la ecuación de Arrhenius, y efectuar un gráfico  $\ln(k)$  vs  $1/T_{\text{absoluta}}$  (Figura 31). En este contexto, para  $n$  experimentos térmicos,  $n \cdot (n-1)/2$  potenciales conjuntos de parámetros cinéticos pueden ser definidos, en el caso de la presente investigación se trabajó con 3 procesos térmicos (A, B y C), siendo el conjunto de pares: AB, AC y BC, como se observa en la Tabla 18.





**Figura 31.** Representación de las tres EIE de la primera iteración del método PEIE (Temperaturas mayores a 100°C)

En la Figura 31 se muestran las tres primeras EIEs (Exposiciones Isotérmicas Equivalentes), intersecciones lineales que permiten establecer el tiempo y la temperatura equivalente para cada iteración, el programa *KineticLab* calcula estos datos matemáticamente, mediante ecuaciones que se resuelven simultáneamente, y que pasan a ser datos de entrada para la siguiente iteración (Tablas 17 a Tabla 22).

**Tabla 18.** Primera iteración (temperaturas superiores a 100°C)

Pares de procesos	Ea (J/mol) (elegidas)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea estimada (kJ/mol)
A	300000	7.91245E-40				
A	600000	2.35588E-80	386.66	26.57	0.41253	
B	300000	8.74993E-40				
B	600000	8.09954E-81	381.88	94.53	0.09247	384.013
A	300000	7.91245E-40				
A	600000	2.35588E-80	386.66	26.57	0.41253	
C	300000	1.76423E-40				
C	600000	1.4671E-82	372.39	212.15	0.0286	223.870
B	300000	8.74993E-40				
B	600000	8.09954E-81	381.88	94.53	0.09247	
C	300000	1.76423E-40				
C	600000	1.4671E-82	372.39	212.15	0.0286	146.230

**Tabla 19.** Segunda iteración

Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea estimado (kJ/mol)
A	384013	3.43356E-51				
A	768026	5.1508E-103	387.05	22.89	0.47897	
B	384013	2.77699E-51				
B	768026	8.8444E-104	382.09	87.19	0.10024	387.565
A	223870	1.62527E-29				
A	447741	8.41698E-60	386.11	31.38	0.34933	
C	223870	8.54014E-30				
C	447741	3.31167E-61	372.27	220.23	0.0275	219.487
B	146230	1.04511E-18				
B	292461	9.42436E-39	381.05	115.90	0.07541	
C	146230	6.83981E-19				
C	292461	2.01594E-39	372.04	232.07	0.0261	138.674

**Tabla 20.** Tercera iteración

Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea estimado (kJ/mol)
A	387565	1.13659E-51				
A	775131	5.6765E-104	387.06	22.76	0.48173	
B	387565	9.06873E-52				
B	775131	9.4616E-105	382.09	86.92	0.10055	387.759
A	219487	6.38843E-29				
A	438974	1.28647E-58	386.06	31.72	0.34557	
C	219487	3.52266E-29				
C	438974	5.62057E-60	372.26	220.78	0.0275	219.267
B	138674	1.13976E-17				
B	277348	1.10614E-36	380.97	117.44	0.07442	
C	138674	7.88621E-18				
C	277348	2.66294E-37	372.00	233.55	0.0259	138.395

**Tabla 21.** Cuarta iteración

Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea (e) (kJ/mol)
A	387759	1.07021E-51				
A	775518	5.0344E-104	387.06	22.75	0.48187	
B	387759	8.53283E-52				
B	775518	8.3778E-105	382.09	86.91	0.10057	387.769
A	219267	6.84325E-29				
A	438533	1.47536E-58	386.06	31.74	0.34538	
C	219267	3.78258E-29				
C	438533	6.4798E-60	372.26	220.81	0.0274	219.256
B	138395	1.24478E-17				
B	276790	1.31872E-36	380.97	117.50	0.07439	
C	138395	8.63054E-18				
C	276790	3.18857E-37	372.00	233.60	0.0259	138.385

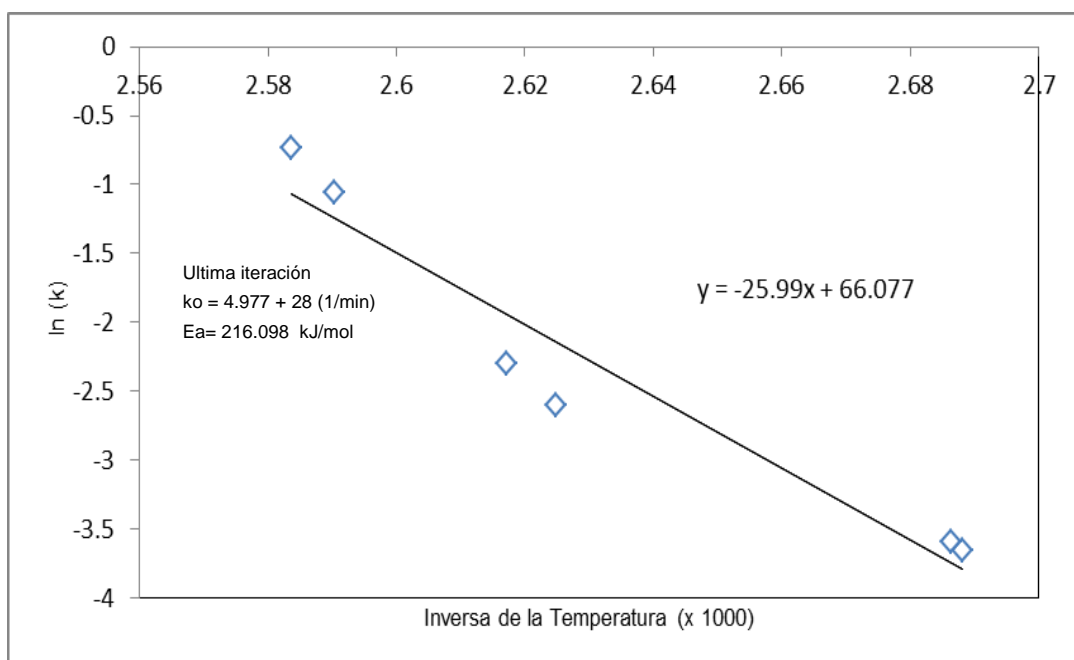
**Tabla 22.** Quinta iteración

Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea (e) (kJ/mol)
A	387769	1.06669E-51				
A	775539	5.0015E-104	387.06	22.75	0.48188	
B	387769	8.50441E-52				
B	775539	8.3222E-105	382.09	86.91	0.10057	387.770
A	219256	6.86659E-29				
A	438511	1.4854E-58	386.06	31.74	0.34537	
C	219256	3.79594E-29				
C	438511	6.52561E-60	372.26	220.81	0.0274	219.255
B	138385	1.24865E-17				
B	276771	1.3269E-36	380.97	117.50	0.07439	
C	138385	8.65796E-18				
C	276771	3.20884E-37	372.00	233.61	0.0259	138.385

**Tabla 23.** Sexta iteración

Pares de procesos	Ea (J/mol)	G	Te (K)	te (seg)	K (1/seg)	Ea (e) (kJ/mol)
A	387770	1.0665E-51				
A	775540	4.9997E-104	387.06	22.75	0.48188	
B	387770	8.50286E-52				
B	775540	8.3192E-105	382.09	86.91	0.10057	387.770
A	219255	6.86775E-29				
A	438510	1.4854E-58	386.06	31.75	0.34526	
C	219255	3.7966E-29				
C	438510	6.52789E-60	372.26	220.81	0.0274	219.255
B	138385	1.24878E-17				
B	276770	1.3269E-36	380.97	117.53	0.07437	
C	138385	8.65892E-18				
C	276770	3.20955E-37	372.00	233.61	0.0259	138.385

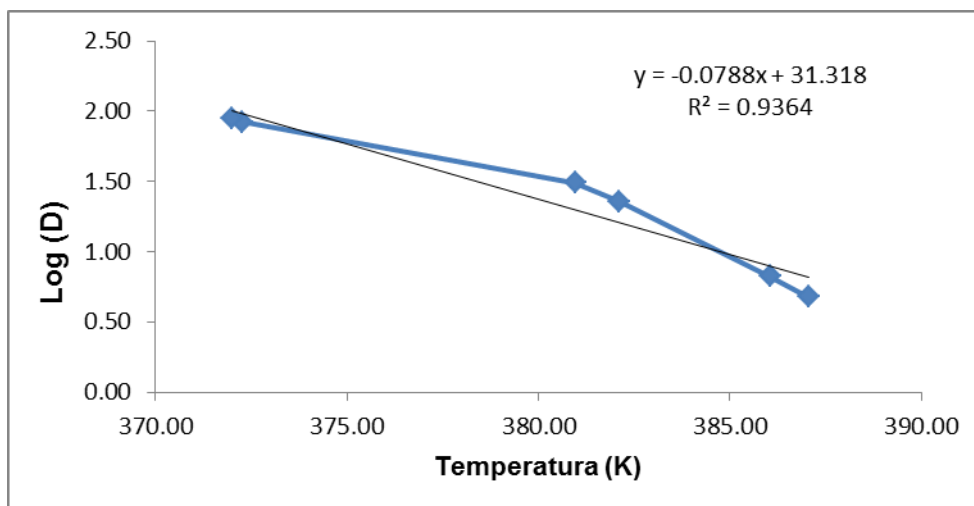
Para encontrar la  $E_a$  y el  $k_o$  finales se graficó el  $\ln k$  vs.  $1/T$  (x 1000), datos tomados de la última iteración. La ecuación y los resultados de la regresión lineal se observan en la Figura 32.



**Figura 32.** Gráfica de Arrhenius, método PEIE (temperaturas superiores a 100°C)

Los parámetros cinéticos encontrados para las esporas *B. subtilis/amyloliquefaciens* en procesos a temperaturas superiores a los 100°C fueron, promedio para tres repeticiones:  $E_a = 218.068 \pm 5.61$  kJ/mol y  $k_o = 2.40E+29$  min<sup>-1</sup>. Welt et al. (1997b) aplicó el método PEIE en la resistencia térmica de esporas de *Bacillus stearotherophilus* (ANC 1518), la media de la energía de activación fue de 250 ( $\pm 15$ ) kJ/mol y la constante de velocidad de reacción (a 121.1°C) de  $k_{121.1^\circ\text{C}} = 0,26$  ( $0,23 < k_{121.1^\circ\text{C}} < 0,30$ ) min<sup>-1</sup>, este estudio fue realizado en un autoclave y conservas de guisantes como medio de inoculación.

El software *KineticLab* aplica la ecuación de Arrhenius para la estimación, en una primera etapa, de las constantes de velocidad ( $k$ ) y la energía de activación ( $E_a$ ), estos parámetros sirven para la determinación del valor  $D_e$  al final del proceso. Con este fin se obtuvo una regresión lineal de los valores  $D_e$  por cada temperatura desarrollada (Figura 33) y en la Tabla 24 se muestran los valores  $D_e$  calculados a partir de estas regresiones.



**Figura 33.** Determinación de valores  $D_e$

**Tabla 24.** Valores  $D$  método PEIE (Temperaturas superiores a 100°C)

	<i>KineticLab D (min)</i>		
	<b>D (100°C)</b>	<b>D (110°C)</b>	<b>D (120°C)</b>
1° repetición	1.41	0.23	0.038
2° repetición	1.13	0.19	0.031
3° repetición	1.59	0.24	0.037
<b>promedio</b>	<b>1.38</b>	<b>0.22</b>	<b>0.037</b>
DESV ST	0.23	0.03	0.006

Si se comparan con los ensayos realizados a temperaturas menores a 100°C (Figura 34 en comparación con la Figura 28), se observa un mayor número de iteraciones, en contraste con el número de datos de la historia térmica de los tres procesos, ingresados al programa. El número de iteraciones representa la cantidad de cálculos que realiza el programa en hallar la convergencia o equidad en resultados de la  $E_a$ , de manera independiente de la cantidad de datos de temperatura.

De acuerdo a diversos estudios, el medio que rodea al microorganismo tiene una gran influencia en su termorresistencia; especialmente el pH, la actividad de agua ( $A_w$ ), y la concentración y diversidad de materiales biológicos en el sistema alimenticio. En tal sentido, el pH de las muestras inoculadas de conservas de espárragos (pH 4.9) fue replicado en una solución buffer. Con esta solución, a condiciones isotérmicas se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos:  $D_{100^\circ C} = 1.17$  min,  $D_{110^\circ C} = 0.72$  min y  $D_{115^\circ C} = 0.46$  min. Por otro lado, al aplicar el método no isotérmico PEIE mediante el

*software KineticLab* los valores obtenidos fueron:  $D_{100^{\circ}\text{C}} = 1.38 \pm 0.23$  min,  $D_{110^{\circ}\text{C}} = 0.22 \pm 0.03$  min y  $D_{120^{\circ}\text{C}} = 0.037 \pm 0.006$  min. Los resultados, presentaron alguna diferencia; el valor  $D_{100^{\circ}\text{C}}$  resultó superior al obtenido en los experimentos isotérmicos en solución buffer, mientras que  $D_{110^{\circ}\text{C}}$  fue menor. Vieira et al. (2002) aplicando el método PEIE, estimaron valores muy cercanos a los hallados experimentalmente por el método isotérmico; sin embargo, inciden en un correcto desarrollo del método a favor de no subestimar el tratamiento térmico de los alimentos por seguridad. Moody (2003) encontró diferencias de 16% a 58°C y 36% a 60°C para valores  $D$  comparados en ambos métodos, señalando que las diferencias entre las curvas TDT observadas podrían tener un impacto en el número de supervivientes previsto cuando se utiliza el modelo matemático PEIE.

Predicción de iteraciones										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ko	1.478122E+0...	4.666274E+0...	4.963192E+0...	4.976559E+0...	4.977166E+0...	4.977196E+0...	4.977197E+0...	4.977197E+0...	4.977197E+0...	4
Ea	212.241958	215.895503	216.089156	216.097574	216.097955	216.097974	216.097974	216.097974	216.097975	2
Procesos	C/Co real	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	It
a	0.000017	0.000099	0.000091	0.000090	0.000090	0.000090	0.000090	0.000090	0.000090	0
b	0.000160	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0
c	0.002333	0.004404	0.005211	0.005236	0.005236	0.005237	0.005237	0.005237	0.005237	0
	SSQ Error	4.321046E-06	8.313641E-06	8.458019E-06	8.458019E-06	8.463826E-06	8.463826E-06	8.463826E-06	8.463826E-06	8

**Figura 34.** Progreso de iteraciones *software KineticLab* (temperaturas superiores a 100°C)

El método PEIE (Welt et al., 1997a) es una herramienta potencial para obtener parámetros cinéticos de una reacción de primer orden, con más precisión que desde experimentos isotérmicos. Este método fue desarrollado con el fin de estimar parámetros cinéticos de un reactante que tenga por lo menos dos exposiciones térmicas. Los autores que emplearon este método, mencionan que es de naturaleza iterativa, siendo aplicable solamente a reacciones de primer orden (Viera et al., 2001). Las ventajas son; que no requiere de una estimación inicial para la  $E_a$ , debido a su naturaleza lineal, además de no tener el mismo grado de dificultad de convergencia que a veces presenta la regresión no lineal (Dolan, 2003). Este método numérico se presenta más preciso porque elimina el ensayo y error de los métodos isotérmicos y procedimientos como el gráfico, debido a que utiliza ecuaciones lineales y sus respectivas pendientes.

Para verificar que los datos reportados por el software son correctos, en la Tabla 25 se muestra la comparación de los resultados hallados empleando el Método PEIE desarrollado

en Microsoft Excel 2007 y el *software KineticLab* en lenguaje Visual .Net 2010. Como se observa, los resultados (con 3 decimales de precisión) obtenidos con ambos programas son iguales, lo que demostraría que lo planteado en Excel fue totalmente implementado en EL *software KineticLab*.

**Tabla 25.** Comparación de resultados entre el Software *KineticLab* y *Excel*

	<i>D<sub>85</sub></i>		<i>D<sub>90</sub></i>		<i>D<sub>95</sub></i>		<i>D<sub>100</sub></i>		<i>D<sub>110</sub></i>		<i>D<sub>120</sub></i>	
	<i>KineticLab</i>	<i>Excel</i>	<i>KineticLab</i>	<i>Excel</i>	<i>KineticLab</i>	<i>Excel</i>	<i>KineticLab</i>	<i>Excel</i>	<i>KineticLab</i>	<i>Excel</i>	<i>KineticLab</i>	<i>Excel</i>
1° rep.	16.194	16.194	7.135	7.135	3.144	3.144	1.413	1.413	1.129	1.129	1.592	1.592
2° rep	17.613	17.613	7.558	7.558	3.243	3.243	0.230	0.230	0.187	0.187	0.242	0.242
3° rep.	16.741	16.741	7.494	7.494	3.355	3.355	0.038	0.038	0.031	0.031	0.037	0.037

Excel constituye una herramienta muy útil para realizar cálculos, particularmente de ingeniería, mediante hojas de cálculo, formulas y funciones, las cuales permitieron el desarrollo paso a paso del método PEIE para luego plasmarlo en lenguaje Visual Basic, en forma escalonada corroborando cada resultado con lo encontrado en Excel.



## V. CONCLUSIONES

1. Los parámetros cinéticos encontrados con el *software KineticLab*, para esporas de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* inoculadas en muestras de conservas de espárragos blancos, a temperaturas inferiores a los 100°C, fueron:  $E_a = 180.454 \pm 4.68$  kJ/mol, valores  $D$  ( $D_{85^\circ C} = 16.85$  min  $\pm$  0.67,  $D_{90^\circ C} = 7.39$  min  $\pm$  0.24 y  $D_{95^\circ C} = 3.24$  min  $\pm$  0.12) y para temperaturas superiores a los 100°C:  $E_a = 218.068 \pm 5.61$  kJ/mol, valores  $D$  ( $D_{100^\circ C} = 1.38$  min  $\pm$  0.23,  $D_{110^\circ C} = 0.22$  min  $\pm$  0.03 y  $D_{120^\circ C} = 0.037$  min  $\pm$  0.006).
2. El método no isotérmico PEIE plasmado en el *software KineticLab* facilita la obtención de valores cinéticos con menos ensayos microbiológicos, ahorrando tiempo y dinero.
3. La metodología propuesta puede ser aplicable a otros modelos de inactivación térmica. Así mismo, es importante mencionar que tanto el método no isotérmico PEIE como el *software KineticLab* fueron planteados y probados con datos reales.
4. Visual Studio .Net permite adaptar el método PEIE, de una manera más sencilla y practica que otros lenguajes de programación.

## VI. RECOMENDACIONES

1. El modelo iterativo desarrollado en este estudio y aplicado en la obtención de parámetros cinéticos del *Bacillus subtilis /amyloliquefaciens* inoculado en muestras de conservas de espárragos blancos puede contribuir a la elaboración de diversos programas de control de calidad en productos de la industria alimentaria.
2. De cara al futuro, la estructura del *software* (y porque el método así lo permite) podrá incluir mayores análisis, estadísticas, dosis y respuestas que se relacionen con la concentración de microorganismos u otros componentes en evaluación.
3. La precisión en la estimación de los parámetros cinéticos de inactivación térmica tienen un impacto significativo en el diseño de procesos del tratamiento térmico, en este sentido, es esencial determinar mediante comparación, qué método proporciona la mejor estimación de estos parámetros.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **APHA 1992.** American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods. 3<sup>rd</sup>. Edition, U.S.A.
- **Brown K. 2000.** Control of bacterial spores. British Medical Bulletin 2000.56 (N 1) 158-171.
- **Brown K., Gaze J., McClement R., y Withers P. 1988.** Construction of a computer controlled thermoresistometer for determination of the heat resistance of bacterial spores over the temperature range 100-150 °C. J. Food Sci. Technol., 23, 361-371.
- **Calero M. 2003.** Una explicación de la programación extrema (XP), V Encuentro de usuarios xBase. Madrid.
- **Cameron E., Esty J. 1940.** Comments on the microbiology of spoilage in canned food. Food Res., 5/459.
- **Cameron M., Leonard S., y Barret E. 1980.** Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree. Applied and Environmental Microbiology. 39: 943-949.
- **Carrasco D. 2006.** Visual Basic. Programación, 1º Edición Editora Macro. Pag. 9, 33 Lima-Perú.
- **Casp A. y Abril J. 1998.** Procesos de Conservación de Alimentos. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid.
- **Chau-Ching L., Bih-Keng W., y Dar-Kuan L. 1968.** Flat Sour Spoilage Bacteria in Canned Asparagus and the Thermal Death Time. Appl Environ Microbiol; 16(1): 45 – 47.
- **Chung H., Birla S. y Tang J. 2007.** Performance evaluation of aluminum test cell designed for determining the heat resistance of bacterial spores in foods LWT – Food Science and Technology.doi: 10.1016/j.lwt.2007.08.024
- **Davis B., Dubelcco R., Eisen H. y Ginseberg H. 1996.** Tratado de Microbiología, cuarta edición. Editorial Masson S.A. Barcelona – España.
- **Diez-Gonzales F., y Russell J. 1997.** The effect of carbonylcyanide- m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and acetate on *Escherichia coli* O157:H7. FEMS Microbiol. Lett. 151: 71-76.

- **Desrosier N. 2001.** Conservación de Alimentos, CECS, 27° Reimpresión, México.
- **Dolan K. 2003.** Estimation of Kinetic Parameters for Nonisothermal Food Processes. *Journal of Food Science* Vol. 68 (3) : 728-741
- **Espinoza C. y Nieto J. 1999.** Informática Básica. Fondo Editorial de la Universidad Nacional del Centro del Perú, Pág. 9-11. Huancayo Perú.
- **Fennema, O. 1993.** Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Tercera edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona - España.
- **Gest H. y Mandelstam 1987.** Longevity of microorganisms in natural environments. *Microbiol. Sci.* 4: 69-71.
- **Giannakourou M., Taoukis P. 2003.** "Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions". *Food Chem.*, 83, 33-41.
- **Giese J. 1994.** Ultrapasteurized liquid whole eggs earn 1994 IFT Food Technology Industrial Achievement Award. *Food Technology* 48 (9): 94:96.
- **Gimenez M. 1990.** Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos presentes en conservas de espárragos. Tesis Universidad de Córdoba - España.
- **Gonçalves I., Marconi S., de Freitas M., Teixeira R., Pereira D. y de Almeida A. 1992.** Principios de esterilização de alimentos. Manual Técnico N° 10. Instituto de Tecnología de Alimentos, Campinas - Brasil.
- **Gómez Sánchez A., Cerón T., Vázquez M., Rodríguez V. y Welti J. 2007.** Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. Volumen 1. Pag. 1-14.
- **Gould G. y Dring J. 1975.** Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature* 258:402-405.
- **Hanlin, J. 1998.** Spoilage of acidic products by *Bacillus* species. *Dairy foods and environmental sanitation* ; 18:655-659.
- **Hersom A. y Hulland E. 1995.** Conservas Alimenticias. Procesado Térmico y Microbiología. Tercera edición, editorial Acribia, Zaragoza, España.
- **Huertas J. 2008.** Efectos de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro y en una sopa comercial. Tesis Pontificia Universidad Javeriana Cartagena – España.
- **Hurtado E. y Cabeza B. 2008.** Proyecto de Importación de Espárragos Verdes Frescos Tesis de Maestría en Comercio Internacional Universidad Complutense de Madrid.
- **ICMSF 1983.** Ecología microbiana de los alimentos, volumen 1 Zaragoza, Acribia, cap. 1.

- **Instituto de Tecnología de Alimentos 1983.** Canned Foods – Principles of Thermal Process Control, Acidification and Container Closure Evaluation, 377p. Campinas, Brasil.
- **Jin T., Zhang H., Boyd G., Tang J. 2007.** Thermal resistance of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* K12 in liquid egg determined by modified Weibull and Bigelow equations. Food Microbiol. 22: 233-239.
- **Juzgado N. 1996.** Procesos de construcción del *software* y ciclos de vida. Universidad Politécnica de Madrid.
- **Kim J. y Naylor H. 1966.** Spore production by *Bacillus stearothermophilus*. Applied Microbiology. 14: 690-691.
- **Klein J. y Lurie S. 1991.** Postharvest heat treatment and fruit quality. Postharv. News Info. 2, 15-19.
- **Kyereme M., Swartzel K., Farkas B. 1999.** New line intersection procedure for the equivalent point of thermal evaluation. Journal of food Science 64 (4), 565-570.
- **Lenz M. y Lund d. 1980.** Experimental procedures for determining destruction kinetic of food components. Food Technol. 34(2): 51-55.
- **León A. 2010.** “Corrección del modelo de Bigelow. Aplicación en el cálculo de los efectos de cocción y de esterilización sobre *Bacillus coagulans* en una conserva de judías verdes (*Phaseolus vulgaris* var. *Helda*)” Tesis doctoral Universidad de Valladolid, España.
- **López M., González I., Condon S. y Bernardo A. 1996.** Effect of pH heating médium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. International Journal of Food Microbiology Vol. 28, 3 405-410.
- **López M. 2012.** “Validación física y biológica de tratamientos térmicos aplicados en un reactor prototipo para la industria alimentaria”. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Cartagena – España.
- **Madigan M., Martinko J. y Parker J. 2003.** Brock Biología de los Microorganismos, Décima edición. Prentice-Hall, Madrid – España. Pág. 689.
- **Maesmans G., Hendrickx M., DeCordt S., and Tobback, P. 1995.** Theoretical consideration of the general validity of the equivalent point method in thermal process evaluation. J. Food Eng. 24: 225–248.
- **Mah J., Kang D., Tang J. (2008).** Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. International Journal of Food Microbiology 128: 385–389.
- **Mejlholm O, Dalgaard P. 2009.** Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes* in lightly preserved and ready-to-eat shrimp. J Food Prot 72(10):2132–43.

- **Moody V. 2003.** Thermal Inactivation kinetics of *Escherichia coli* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice. Dissertation, Agricultural and Biological Engineering Department, presented to Graduate School of University of Florida.
- **Montañez y Castro 2006.** Resistencia de las endosporas de *Bacillus* en ambientes terrestres extremos.
- **Montville T. y Sapers G. 1981.** Thermal Resistance of Spores from pH, Elevating Strains of *Bacillus licheniformis*. Journal of Food Science 46 (6): 1710-1712.
- **Murrieta M. 1988.** Esterilización de medios de cultivo para procesos de fermentación. Hermosillo, Sonora: Editorial Universidad de Sonora. Escuela de Ciencias Químicas.
- **Nakayama A., Yano Y., Kobayashi M., Ishikawa I., Sakai K., 1996.** Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. Applied and Environmental Microbiology 62: 3897-3900.
- **Odlaug T. y Pflug I. 1977.** Thermal destruction of Clostridium botulinum spores suspended in tomato juice in aluminum thermal death time tubes. Appl. Environ. Microbiol. 34: 23-29.
- **Oh Y. y Fresse E., 1976.** Manganese Requirement of Phosphoglycerate Phosphomutase and its Consequences for Growth and Sporulation of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 127:739-746.
- **Pal SS. 1998.** Interactions o fan acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerante crops. Plant and Soil. 198: 169-177.
- **Palop A., Manas P., Condon S. 1999.** Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: A review. Journal of Food Safety Vol: 19, Issue: 1, Pages: 57-72
- **Palop A., Raso J., Pagan R., Condon S., Sala F. 1996.** Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. Journal of food microbiology 29:1-10.
- **Pascual R. y Calderón V. 1999.** Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. Segunda edición, Madrid - España.
- **Potter N. y Hotchkiss J 1999.** Ciencia de los Alimentos. Tercera edición, editorial Acribia, Zaragoza, España.
- **Prescott L., Harley J., Klein D. 1999.** Microbiología. Primera edición. Ed. McGraw-Hill interamericana. Madrid, España, Pág. 113-115.
- **Raisman J. 2008.** Endósporas y Formas de Persistencia. Hipertextos del Area de Biología. Universidad Nacional del Nordeste República Argentina.

- **Rayo A. 2010.** Visual Studio 2010 y .Net 4 Novedades. 1° edición, Luarna ediciones S.L. Madrid – España.
- **Robert T. and Hitchins A (1969)** Resistance of spore. In: The Bacterial Spore (Goul GW Hurst A, eds) Academic Press, London, 612-670
- **Splittstoesser D., Churey J., Lee C. 1994.** Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. J. Food Prot. 57, 1080-1083.
- **Sommerville I. 2002.** Ingeniería de Software, Pearson Educación.
- **Stumbo, C. 1973.** Thermobacteriology in Food Processing, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York.
- **Swartzel K. 1982.** Arrhenius kinetics as applied to product constituent losses in ultra high temperature processing. Journal Food Sci. 47(6): 1886 – 1891.
- **Tortora G., Funke B. y Case C. 2007.** Introducción a la Microbiología. Novena edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina, Pág. 190
- **Ureña M. y Elías C. 2004.** Tratamiento Térmico de Alimentos. Capítulo I, Aspectos Físicos y Microbiológicos del Tratamiento Térmico, Lima – Perú Pág. 1-6.
- **Viera M., Teixeira A. y Silva C. 2001.** Kinetic Parameters Estimation for Ascorbic Acid Degradation in Fruit Nectar Using the Partial Equivalent Isothermal Exposures (PEIE) Method under Non-Isothermal Continuous Heating Conditions. Biotechnol. Prog. 2001, 17, 175-181.
- **Viera M., Teixeira A., Silva F. Gaspar N. y Silva C. 2002.** *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. Journal of Food Microbiology 77 (2002) 71 – 78.
- **Velezmoro C., Zuñiga D., Teixeira A., Benites E., Gomero A., Pahuara D. y Ramos E. 2007.** Informe Técnico Final “Evaluación de microorganismos de importancia para el tratamiento térmico en la cadena productiva de conservas de espárrago blanco (*Asparagus officinalis*)” Proyecto de Investigación en Ciencia y Tecnología PROCOM.
- **Velezmoro C., Ramos E., García C., Benites E., Teixeira A. y Zuñiga D. 2009.** Informe Técnico Final “Identificación de bacterias del género *Bacillus* aisladas de la cadena productiva de espárrago blanco (*Asparagus officinalis*)” Proyecto de Investigación en Ciencia y Tecnología PROCYT 338 – 2007 – CONCYTEC - OAJ.
- **Welt B., Teixeira A., Balaban M., Smerage G., y Sage D. 1997a.** Iterative Method for Kinetic Parameter Estimation from Dynamic Thermal Treatments. Journal of Food Science. 62 (1): 8-14

- **Welt B., Teixeira A., Balaban M., Smerage G., Hintinlang D. y Smittle B. 1997b.** Kinetics Parameter Estimation in Conduction Heating Foods Subjected to Dynamic Thermal Treatments . Journal of Food Science. 62 (3): 529-534
- **Yuk H-G., Geveke D., Zhang H., Jin T. 2009.** Comparison of aluminum thermal-death-time disks with a pilot-scale pasteurizer on the thermal inactivation of Escherichia coli K12 in apple cider. Food Control 20 1053-1057

**Andina 2011.** Agencia Peruana de Noticias. **Maximixe prevé recuperación de exportación de espárragos en conserva luego que cayeron 7.1% en el 2010.** [En línea] Fecha de ingreso: 9 de abril del 2011. URL disponible en:  
<http://www.andina.com.pe/Espanol/Noticia.aspx?id=YqOqRp2nd6M>

**Infoagro 2010.** Microorganismos productores de alteraciones en los alimentos enlatados. Anaerobios esporulados. [En línea] Fecha de ingreso: 10 de mayo 2011. URL disponible en:  
<http://canales.hoy.es/canalagro/datos/conservas/microorganismos2.htm#2.2>.  
**ANAEROBIOS ESPORULADOS**

**IPEH 2009.** Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas. Zonas de Producción. [En línea] Fecha de ingreso: 10 de abril del 2011. URL disponible en:  
<http://www.ipeh.org/espa-zp.asp>

**Codex Alimentarius.** Normas oficiales. NORMA DEL CODEX PARA LOS ESPARRAGOS EN CONSERVA CODEX STAN 56-1981 [En línea] fecha de ingreso: 01 de marzo del 2011. URL disponible en:  
[http://s3.esoft.com.mx/esofthands/include/upload\\_files/4/Archivos/Norma%20para%20los%20Esparragos%20en%20Conserva.pdf](http://s3.esoft.com.mx/esofthands/include/upload_files/4/Archivos/Norma%20para%20los%20Esparragos%20en%20Conserva.pdf)

**Tecnológico 2004.** Software Programación. [En línea] fecha de ingreso: 05 de mayo del 2011. URL disponible en:  
<http://www.mitecnologico.com/Main/SoftwareProgramacion>

**DCE 2005.** Fundamentos de Programación. Desarrollador Cinco Estrellas. [En línea] fecha de ingreso: 12 de octubre del 2011. URL disponible en:  
<http://www.mslatam.com/latam/msdn/comunidad/dce2005/>

**El Comercio 2014.** Exportación de espárragos peruanos en el 2014. [En línea] fecha de ingreso: 12 de octubre del 2011. URL disponible en:  
<http://elcomercio.pe/economia/peru/exportacion-peruana-esparragos-se-contraria-5-2014-noticia-1757159>



# ANEXOS

## ANEXO I

### MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA EL ANÁLISIS

#### Medio de esporulación (Modificado de Kim y Naylor, 1966)

Composición (g/L)	
Extracto de carne	3 g
Peptona bacteriológica	5 g
Extracto de levadura	4 g
Sulfato de manganeso	0.01 g
Bacto-agar	20 g

Preparación: Autoclavar a 121°C por 15 minutos. pH = 7.2

#### Agar TGE

Composición (g/L)	
Peptona de caseína	5 g
Extracto de carne	3 g
D-glucosa	1 g
Agar	15 g

Preparación: Autoclavar a 121°C por 15 minutos. pH = 7.0 ± 0.2

#### Solución Buffer Fosfato Butterfield's

Composición (g/L)	
Fosfato de potasio monobásico	0.0425 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación: Autoclavar a 121°C por 15 minutos. pH = 7.2

#### Solución McIlvaine

Composición (g/L)	
Fosfato de sodio bibásico	13.723 g
Acido cítrico	12.913 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación: Autoclavar a 121°C por 15 minutos. pH = 4.0

## ANEXO II

### MEDIDAS DE LA TEMPERATURA (°C) SEGÚN EL TIEMPO (SEGUNDOS)

**Tabla 2.1.** Tiempo de llegada: 85, 90 y 95°C.

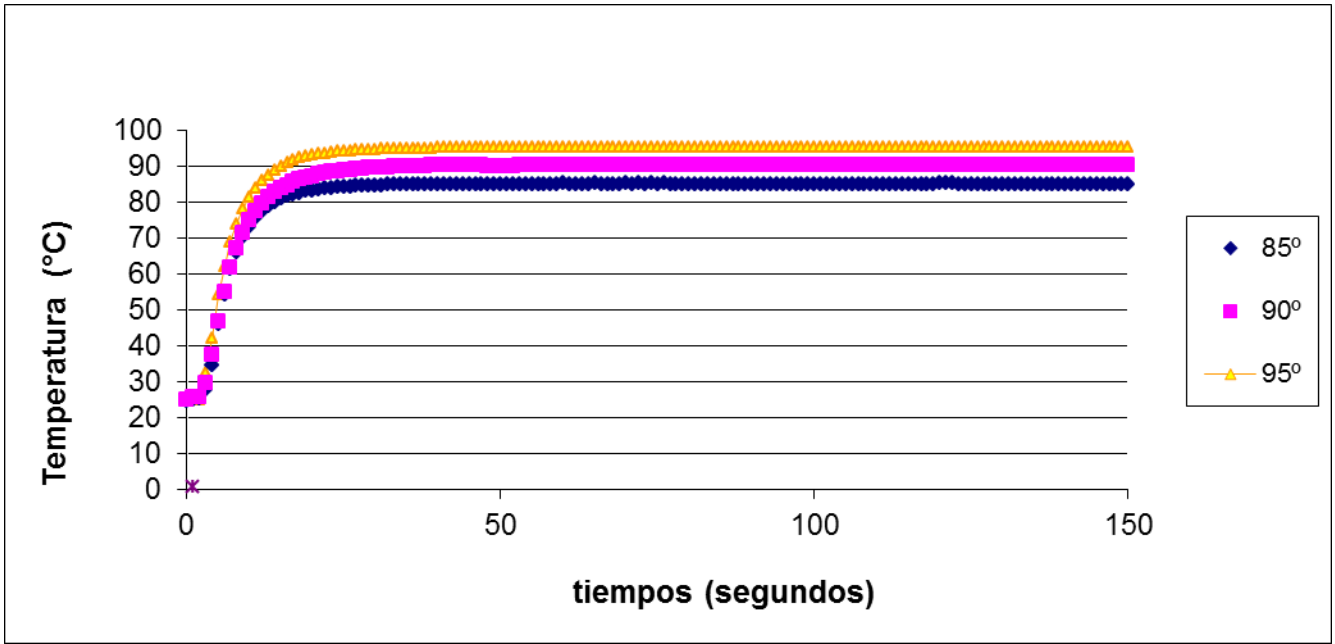
tiempo	Temperaturas		
	Tratamiento a 85 °C	Tratamiento a 90 °C	Tratamiento a 95 °C
0	24.887293	25.006359	24.871872
1	24.98661	25.815952	25.000162
2	25.547272	25.841872	25.079002
3	27.911654	29.784225	32.694278
4	34.735608	37.501633	42.199767
5	46.332518	46.966798	54.295846
6	54.434127	55.164271	62.29284
7	61.374122	61.713066	68.895169
8	66.26691	67.314215	74.129016
9	70.301638	71.379043	78.405571
10	73.29155	75.052127	81.504844
11	75.713571	77.674233	83.968899
12	77.594969	79.716623	86.011083
13	79.037674	81.441185	87.698034
14	80.154571	82.763959	89.051131
15	80.985558	83.927502	90.100876
16	81.680542	84.870981	90.975617
17	82.257004	85.660084	91.781067
18	82.725192	86.355147	92.416399
19	83.113801	86.923627	92.810944
20	83.419182	87.37464	93.150822
21	83.671286	87.796493	93.467428
22	83.906312	88.192694	93.764161
23	84.090537	88.493122	93.961294
24	84.254582	88.738522	94.216198
25	84.373339	88.945391	94.320866
26	84.489135	89.123587	94.471617
27	84.576364	89.326848	94.584305
28	84.67984	89.446476	94.715088
29	84.720601	89.565185	94.778388
30	84.774934	89.678544	94.850334
31	84.840427	89.812693	94.935174
32	84.893137	89.871399	95.011954
33	84.945345	89.971528	95.056399
34	84.947685	90.052718	95.087049
35	85.00498	90.076872	95.115473
36	85.049351	90.1315	95.132832
37	85.022185	90.180335	95.158777
38	85.056395	90.22133	95.209603

**Tabla 2.2.** Tiempo de llegada a las temperaturas de trabajo: 100, 110, 115 y 120 °C.

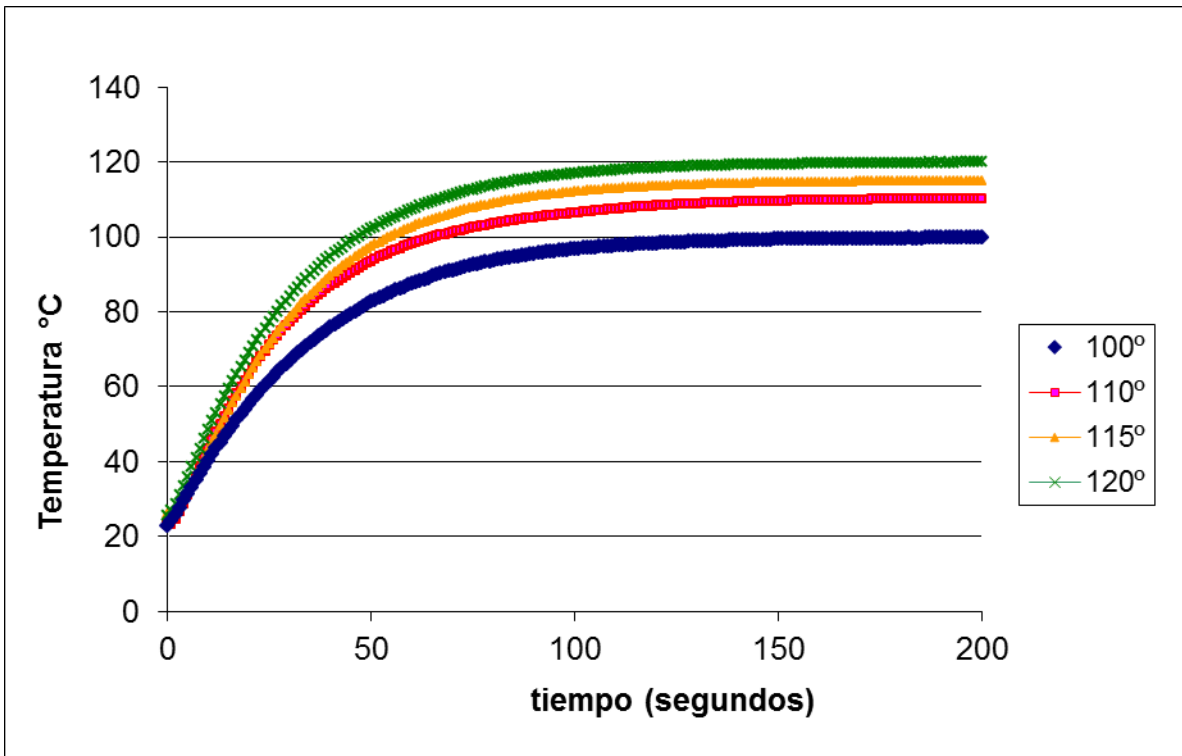
tiempo	Temperaturas			
	100 ° C	110 ° C	115 ° C	120 ° C
0	23.004414	23.080033	25.790091	25.618162
1	24.293053	23.249389	26.300557	26.894251
2	26.041484	24.682985	27.400954	28.777759
3	27.824953	26.599746	28.811545	31.041917
4	29.638769	28.748738	30.442663	33.544232
5	31.437339	31.102292	32.266196	35.998974
6	33.293751	33.56697	34.250936	38.516627
7	35.102832	36.013893	36.341386	41.007546
8	36.89532	38.522136	38.536096	43.503326
9	38.576002	40.978448	40.731568	46.009222
10	40.275001	43.321654	42.927494	48.455611
11	41.969797	45.640571	45.135205	50.839947
12	43.582652	47.843364	47.295861	53.148157
13	45.141562	50.003632	49.448862	55.336343
14	46.725914	52.078099	51.573379	57.480552
15	48.222703	54.116473	53.610085	59.522493
16	49.711653	56.088075	55.600699	61.487139
17	51.185374	57.964814	57.533512	63.391056
18	52.631366	59.848573	59.476793	65.276101
19	53.993577	61.605581	61.318843	67.141574
20	55.299664	63.342104	63.149398	69.009185
21	56.583392	64.951425	64.928719	70.723767
22	57.861095	66.575933	66.643781	72.467309
23	59.124404	68.07807	68.305022	74.098719
24	60.350128	69.567749	69.927544	75.678955
25	61.506229	70.992762	71.475968	77.230521
26	62.678348	72.358756	72.978991	78.714311
27	63.764244	73.660847	74.410777	80.160979
28	64.874861	74.916298	75.819587	81.552491
29	65.934611	76.104109	77.206102	82.893017
30	66.97643	77.282438	78.525673	84.228563
31	67.97267	78.410955	79.787549	85.481997
32	68.987952	79.474034	81.055064	86.663849
33	69.900364	80.501971	82.272826	87.831619
34	70.844954	81.504528	83.425993	88.932512
35	71.73531	82.469326	84.528031	90.001865
36	72.620361	83.3975	85.624549	91.017629
37	73.441687	84.31045	86.639978	92.032305
38	74.265798	85.176801	87.662383	92.974719
39	75.046432	86.014702	88.616098	93.877055
40	75.865457	86.800113	89.576019	94.759138
41	76.624112	87.592638	90.470777	95.600584
42	77.34231	88.329371	91.364319	96.408378
43	78.061576	89.072917	92.197143	97.18774
44	78.736454	89.758213	93.007325	97.97828
45	79.421125	90.43781	93.816455	98.704993
46	80.078267	91.089525	94.584595	99.451655
47	80.736694	91.72376	95.320267	100.164241
48	81.392107	92.31471	96.031026	100.852981
49	81.978569	92.927511	96.677405	101.459146

50	82.584257	93.482746	97.362403	102.119863
51	83.167576	94.026446	97.986755	102.71376
52	83.682357	94.566549	98.609322	103.298423
53	84.223029	95.059467	99.166188	103.861341
54	84.7493	95.53333	99.739686	104.426575
55	85.208809	96.006311	100.310364	104.916344
56	85.734275	96.473622	100.843063	105.433139
57	86.196232	96.879502	101.341668	105.928296
58	86.631167	97.316305	101.80063	106.431506
59	87.079056	97.696649	102.26961	106.897557
60	87.518183	98.082638	102.723069	107.394667
61	87.976254	98.460151	103.151494	107.825916
62	88.314612	98.811198	103.58181	108.254616
63	88.696515	99.162448	104.00335	108.641115
64	89.065514	99.464992	104.365887	109.03123
65	89.427188	99.802239	104.743042	109.421058
66	89.826045	100.093127	105.093884	109.797692
67	90.135384	100.386569	105.423548	110.172127
68	90.504967	100.669817	105.780104	110.554311
69	90.823325	100.925191	106.130089	110.878467
70	91.128443	101.199638	106.443822	111.212931
71	91.417381	101.461463	106.756498	111.514062
72	91.704902	101.717263	106.999883	111.826117
73	91.980055	101.96802	107.274998	112.095087
74	92.253357	102.186573	107.556742	112.397038
75	92.548004	102.431922	107.80117	112.677568
76	92.806735	102.635867	108.055223	112.950743
77	93.032624	102.859397	108.289092	113.205208
78	93.250557	103.097517	108.54829	113.400946
79	93.489109	103.290267	108.757109	113.666885
80	93.723454	103.51146	109.012937	113.901534
81	93.953756	103.69408	109.223547	114.115912
82	94.127291	103.875714	109.453538	114.313445
83	94.344788	104.050151	109.655517	114.534904
84	94.506638	104.224607	109.834595	114.729314
85	94.716366	104.415888	110.031133	114.889056
86	94.859915	104.545928	110.184765	115.082133
87	95.068137	104.694301	110.352131	115.281067
88	95.205796	104.869749	110.493787	115.405305
89	95.351812	104.989397	110.689312	115.579757
90	95.516077	105.132693	110.821974	115.700495
91	95.671487	105.274483	110.992932	115.863809
92	95.803138	105.41548	111.130937	116.003273
93	95.94038	105.568952	111.264678	116.123184
94	96.087719	105.664994	111.407756	116.248106
95	96.225117	105.782549	111.533388	116.392004
96	96.335284	105.88758	111.651452	116.488479
97	96.43757	106.03675	111.747232	116.580727
98	96.550776	106.135578	111.852115	116.730966
99	96.651718	106.249416	111.967765	116.809041
100	96.780938	106.383801	112.07073	116.931744
101	96.900092	106.481349	112.16954	117.047881
102	97.014088	106.618461	112.289085	117.170814
103	97.087159	106.716092	112.354845	117.258257

104	97.203433	106.823117	112.472878	117.315337
105	97.273513	106.94662	112.523313	117.46564
106	97.354689	107.038813	112.617544	117.536663
107	97.443286	107.139378	112.702539	117.581694
108	97.489492	107.264088	112.797933	117.691964
109	97.580588	107.375263	112.865989	117.763965
110	97.66803	107.444002	112.918436	117.849891
111	97.720908	107.546446	113.020631	117.933732
112	97.809555	107.655834	113.062718	117.999177
113	97.850144	107.763275	113.122476	118.051663
114	97.925518	107.830203	113.202412	118.161156
115	97.996523	107.896168	113.259729	118.183137
116	98.064254	107.978909	113.29858	118.240624
117	98.132599	108.041755	113.363461	118.289135
118	98.184479	108.125423	113.426738	118.3691
119	98.223111	108.211664	113.472795	118.422387
120	98.268936	108.298352	113.540334	118.476722
121	98.35935	108.345447	113.588876	118.531091
122	98.393004	108.408316	113.627815	118.604339
123	98.4392	108.482276	113.682945	118.646238
124	98.473143	108.520878	113.728394	118.670142
125	98.540575	108.585401	113.754602	118.741062
126	98.590786	108.642626	113.812171	118.775781
127	98.6121	108.698065	113.879511	118.817551
128	98.68509	108.739196	113.90723	118.85626
129	98.717152	108.814033	113.948237	118.905381
130	98.734378	108.850288	113.984939	118.945431
131	98.805495	108.895976	114.001783	118.952415
132	98.82977	108.971619	114.07419	118.989423
133	98.862378	109.007943	114.104238	119.013496
134	98.910853	109.043011	114.120504	119.086616
135	98.954838	109.082195	114.154437	119.069685
136	98.971971	109.121243	114.168983	119.138968
137	98.98853	109.15583	114.225507	119.16125
138	99.035749	109.215	114.249376	119.19424
139	99.065482	109.232607	114.276261	119.226121
140	99.097287	109.279385	114.308922	119.241414



**Figura 1.** Curvas de tiempo de llegada de las muestras de puré de espárragos a la temperatura constante (menores a 100°C)



**Figura 2.** Curvas de tiempo de llegada de las muestras de puré de espárragos a la temperatura constante (mayores a 100°C)

## ANEXO III

### HOJAS DE REPORTE *Softwarfe KineticLab*

#### 3.1 Hoja de reporte software *KineticLab* (temperaturas inferiores a 100°C) primera muestra

Microorganismo	
----------------	--

Muestra	
---------	--

pH	
----	--

	Proceso A		Proceso B		Proceso C
	95 °C x 15 min.		90 °C x 25 min.		85 °C x 35 min.
Concentración inicial	75000000		75000000		75000000
Concentración final	600		16000		420000

Ea (i)	300000
--------	--------

Ecuación lineal	54.354 + -21.624X	
-----------------	-------------------	--

Ko	4.03E+23	
----	----------	--

Ea	179.795	kJ/mol
----	---------	--------

Temp. en C°	D en seg.	D en min.	Log (D)		K (1/min)
95	188.62	3.144	0.497		0.733
90	428.098	7.135	0.853		0.323
85	971.627	16.194	1.209		0.142



### 3.2 Hoja de reporte software *KineticLab* (temperaturas inferiores a 100°C) segunda muestra

Microorganismo	
----------------	--

Muestra	
---------	--

pH	
----	--

	Proceso A		Proceso B		Proceso C
	95 °C x 15 min.		90 °C x 25 min.		85 °C x 35 min.
Concentración inicial	18000000		18000000		18000000
Concentración final	110		13000		120000

Ea (i)	300000
--------	--------

Ecuación lineal	56.164 + -22.302X	
-----------------	-------------------	--

Ko	2.465E+23	
----	-----------	--

Ea	185.433	kJ/mol
----	---------	--------

Temp. en C°	D en seg.	D en min.	Log (D)		K (1/min)
95	194.606	3.243	0.511		0.71
90	453.493	7.558	0.878		0.305
85	1056.78	16.613	1.246		0.131

### 3.3 Hoja de reporte software *KineticLab* (temperaturas inferiores a 100°C) tercera muestra

Microorganismo	
----------------	--

Muestra	
---------	--

pH	
----	--

	Proceso A		Proceso B		Proceso C
	95 °C x 15 min.		90 °C x 25 min.		85 °C x 35 min.
Concentración inicial	62000000		62000000		62000000
Concentración final	540		48000		310000

Ea (i)	300000
--------	--------

Ecuación lineal	53.092 + -21.18X	
-----------------	------------------	--

Ko	1.142 E+23	
----	------------	--

Ea	176.135	kJ/mol
----	---------	--------

Temp. en C°	D en seg.	D en min.	Log (D)		K (1/min)
95	201.29	3.355	0.526		0.686
90	449.653	7.494	0.875		0.307
85	1004.457	16.741	1.224		0.138

### 3.4 Hojas de reporte software *KineticLab* (temperaturas superiores a 100°C) primera muestra

Microorganismo	
----------------	--

Muestra	
---------	--

pH	
----	--

	Proceso A	Proceso B	Proceso C
	120 °C x 90 seg.	110 °C x 3 min.	100 °C x 5 min.
Concentración inicial	15000000	15000000	15000000
Concentración final	260	2400	35000

Ea (i)	300000
--------	--------

Ecuación lineal	66.077 + -25.990X
-----------------	-------------------

Ko	4.98E+28
----	----------

Ea	216.098 kJ/mol
----	----------------

Temp. en C°	D en seg.	D en min.	Log (D)		K (1/min)
120	2.252	0.038	-1.42		60.605
110	13.818	0.23	-0.638		10.013
100	84.795	1.413	0.15		1.63

### 3.5 Hojas de reporte software *KineticLab* (temperaturas superiores a 100°C) segunda muestra

Microorganismo	
----------------	--

Muestra	
---------	--

pH	
----	--

	Proceso A	Proceso B	Proceso C
	120 °C x 90 seg.	110 °C x 3 min.	100 °C x 5 min.
Concentración inicial	15000000	15000000	15000000
Concentración final	260	2400	35000

Ea (i)	300000
--------	--------

Ecuación lineal	66.077 + -25.990X
-----------------	-------------------

Ko	4.98E+28
----	----------

Ea	216.098 kJ/mol
----	----------------

Temp. en C°	D en seg.	D en min.	Log (D)		K (1/min)
120	2.252	0.038	-1.42		60.605
110	13.818	0.23	-0.638		10.013
100	84.795	1.413	0.15		1.63

### 3.6 Hojas de reporte software *KineticLab* (temperaturas superiores a 100°C) tercera muestra

Microorganismo	
----------------	--

Muestra	
---------	--

pH	
----	--

	Proceso A	Proceso B	Proceso C
	120 °C x 90 seg.	110 °C x 3 min.	100 °C x 5 min.
Concentración inicial	15000000	15000000	15000000
Concentración final	260	2400	35000

Ea (i)	300000
--------	--------

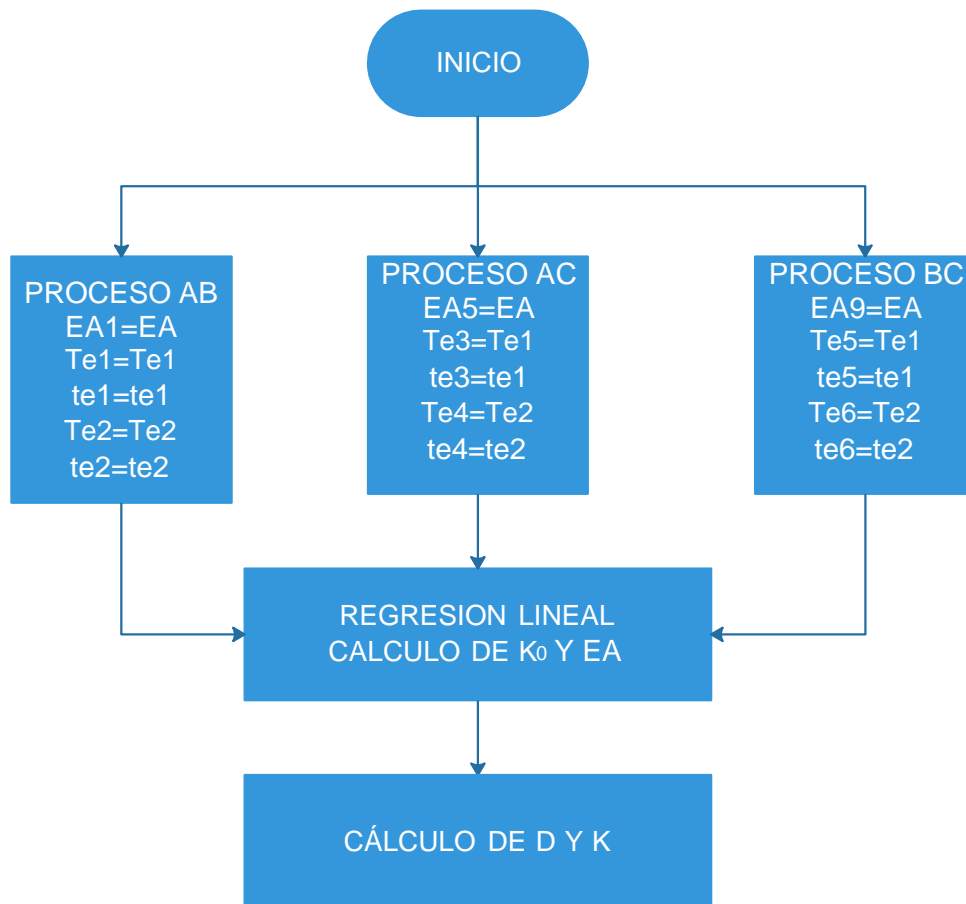
Ecuación lineal	66.077 + -25.990X
-----------------	-------------------

Ko	4.98E+28
----	----------

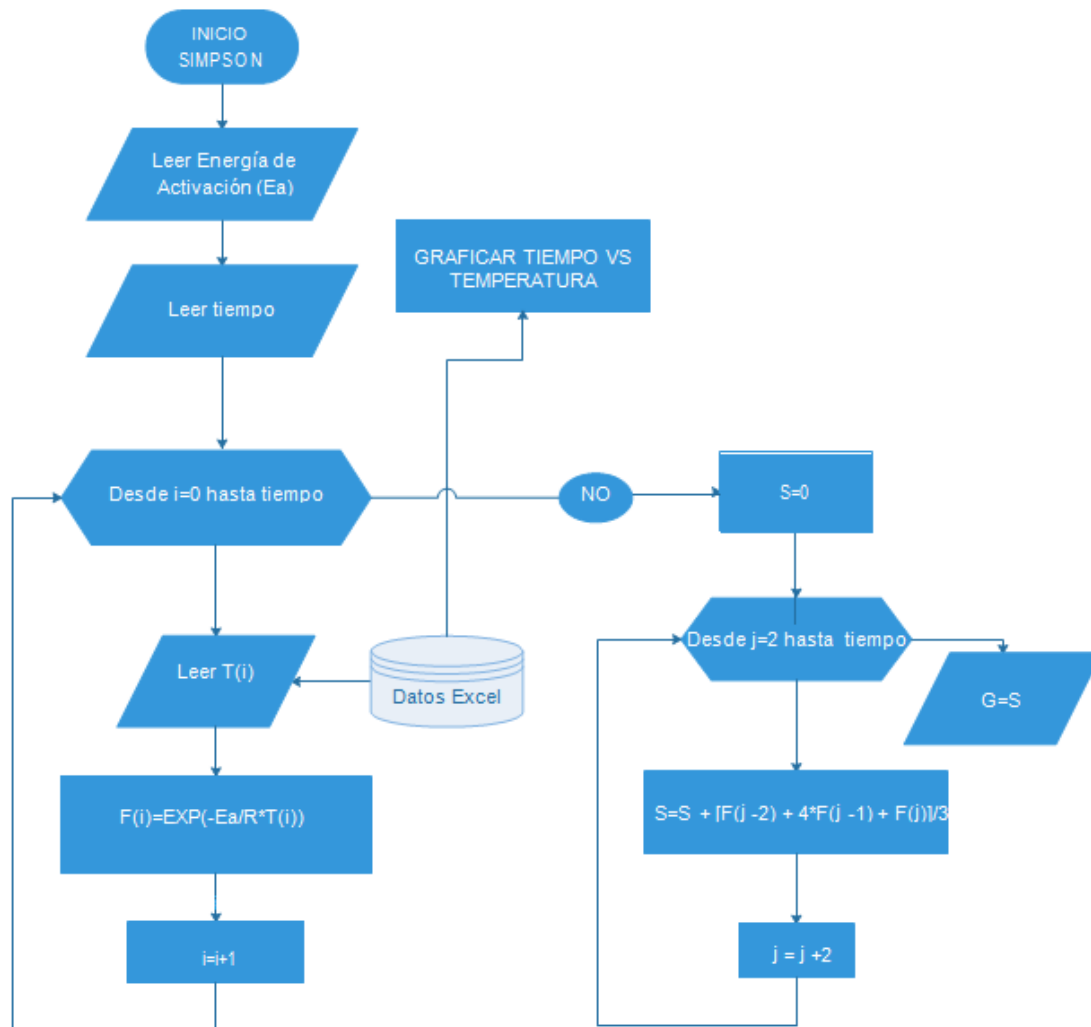
Ea	216.098 kJ/mol
----	----------------

Temp. en C°	D en seg.	D en min.	Log (D)		K (1/min)
120	2.252	0.038	-1.42		60.605
110	13.818	0.23	-0.638		10.013
100	84.795	1.413	0.15		1.63

ANEXO IV. Diagrama de flujo *software KineticLab*



**ANEXO V. DIAGRAMA DE FLUJO** *software KineticLab* Método de Simpson



## ANEXO VI. LISTADO DEL SOFTWARE *KineticLab*

### 6.1. Función PEIE

```
Public Function PEIE(ByVal 2As Double, ByVal ea5 As Double, ByVal ea9 As Double,  
ByVal s As Array) As Array
```

```
'*****
```

```
    'valores r: constante universal de los gases ideales  
        ea: energía de activación  
        te: temperature equivalente  
        ts: tiempo equivalente  
        K: constant de velocidad  
        Cti:concentración inicial de microorganismos  
        Ctf:concentración final de microorganismos
```

```
Dim r As Double  
r = 8.3145
```

```
Dim ea2 As Double  
Dim ea3 As Double  
Dim ea4 As Double  
Dim ea6 As Double  
Dim ea7 As Double  
Dim ea8 As Double  
Dim ea10 As Double  
Dim ea11 As Double  
Dim ea12 As Double
```

```
Dim te1 As Double  
Dim te2 As Double  
Dim te3 As Double  
Dim te4 As Double  
Dim te5 As Double  
Dim te6 As Double
```

```
Dim ts1 As Double  
Dim ts2 As Double  
Dim ts3 As Double  
Dim ts4 As Double  
Dim ts5 As Double  
Dim ts6 As Double
```

```
Dim k1 As Double  
Dim k2 As Double  
Dim k3 As Double  
Dim k4 As Double  
Dim k5 As Double  
Dim k6 As Double
```

```
Dim ct1i As Integer  
Dim ct1f As Integer
```

```
Dim ct2i As Integer  
Dim ct2f As Integer
```

```
Dim ct3i As Integer  
Dim ct3f As Integer
```

```
Dim eae1 As Double  
Dim eae2 As Double
```



Dim eae3 As Double

```
ct1i = mdlVariables.concentracionTemp1_Inicial  
ct1f = mdlVariables.concentracionTemp1_Final
```

```
ct2i = mdlVariables.concentracionTemp2_Inicial  
ct2f = mdlVariables.concentracionTemp2_Final
```

```
ct3i = mdlVariables.concentracionTemp3_Inicial  
ct3f = mdlVariables.concentracionTemp3_Final
```

```
ea1 = ea1  
ea2 = ea1 * 2  
ea3 = ea1  
ea4 = ea2  
ea5 = ea5  
ea6 = ea5 * 2  
ea7 = ea5  
ea8 = ea6  
ea9 = ea9  
ea10 = ea9 * 2  
ea11 = ea9  
ea12 = ea10
```

```
te1 = (ea2 - ea1) / (r * Math.Log(s(1) / s(2)))  
te2 = (ea4 - ea3) / (r * Math.Log(s(3) / s(4)))  
te3 = (ea6 - ea5) / (r * Math.Log(s(5) / s(6)))  
te4 = (ea8 - ea7) / (r * Math.Log(s(7) / s(8)))  
te5 = (ea10 - ea9) / (r * Math.Log(s(9) / s(10)))  
te6 = (ea12 - ea11) / (r * Math.Log(s(11) / s(12)))
```

```
ts1 = Math.Exp(Math.Log(s(1)) + ea1 / (r * te1))  
ts2 = Math.Exp(Math.Log(s(3)) + ea3 / (r * te2))
```

```
ts3 = Math.Exp(Math.Log(s(5)) + ea5 / (r * te3))  
ts4 = Math.Exp(Math.Log(s(7)) + ea7 / (r * te4))  
ts5 = Math.Exp(Math.Log(s(9)) + ea9 / (r * te5))  
ts6 = Math.Exp(Math.Log(s(11)) + ea11 / (r * te6))
```

```
k1 = (-Math.Log(ct1f / ct1i)) / (ts1)  
k2 = (-Math.Log(ct2f / ct2i)) / (ts2)  
k3 = (-Math.Log(ct1f / ct1i)) / (ts3)  
k4 = (-Math.Log(ct3f / ct3i)) / (ts4)  
k5 = (-Math.Log(ct2f / ct2i)) / (ts5)  
k6 = (-Math.Log(ct3f / ct3i)) / (ts6)
```

```
eae1 = (r * Math.Log(k1 / k2)) / ((te1 - te2) / (te1 * te2))  
eae2 = (r * Math.Log(k3 / k4)) / ((te3 - te4) / (te3 * te4))  
eae3 = (r * Math.Log(k5 / k6)) / ((te5 - te6) / (te5 * te6))
```

Dim salida(2)

```
salida(0) = eae1  
salida(1) = eae2  
salida(2) = eae3
```

```
r_k(0) = k1  
r_k(1) = k2
```

```

r_k(2) = k3
r_k(3) = k4
r_k(4) = k5
r_k(5) = k6

r_te(0) = te1
r_te(1) = te2
r_te(2) = te3
r_te(3) = te4
r_te(4) = te5
r_te(5) = te6

r_g(0) = s(1)
r_g(1) = s(2)
r_g(2) = s(3)
r_g(3) = s(4)
r_g(4) = s(5)
r_g(5) = s(6)
r_g(6) = s(7)
r_g(7) = s(8)
r_g(8) = s(9)
r_g(9) = s(10)
r_g(10) = s(11)
r_g(11) = s(12)

PEIE = salida

```

End Function

## 6.2 Formulario Iteraciones

```

Public Class frmIteraciones
Private Sub Button1_Click(ByVal sender As System.Object, ByVal e As
System.EventArgs) Handles Button1.Click
Close()
End Sub

Private Sub frmIteraciones_Load(ByVal sender As System.Object, ByVal e As
System.EventArgs) Handles MyBase.Load
Me.Text = mdlVariables.tituloAplicacion
mdlVariables.haIterado = True

Dim resultado As System.Array
Dim x As Integer

Dim Ene_act(20, 3) As Double
Dim iteracion As Integer

Dim s(12) As String
Dim nt1 As Integer
Dim nt2 As Integer
Dim nt3 As Integer

Dim fx1(6000) As Double
Dim fx2(6000) As Double
Dim fx3(6000) As Double

```

```

Dim R As Double
Dim ea1 As Double
Dim ea2 As Double
Dim ea3 As Double
Dim ea4 As Double
Dim ea5 As Double
Dim ea6 As Double
Dim ea7 As Double
Dim ea8 As Double
Dim ea9 As Double
Dim ea10 As Double
Dim ea11 As Double
Dim ea12 As Double

'*****
'valores iniciales para la 1ra ite.
R = 8.3145

ea1 = mdlVariables.energiaActivacionInicial
ea2 = ea1 * 2
ea3 = ea1
ea4 = ea2
ea5 = ea1
ea6 = ea5 * 2
ea7 = ea5
ea8 = ea6
ea9 = ea1
ea10 = ea9 * 2
ea11 = ea9
ea12 = ea10

nt1 = mdlVariables.cantidadTemp1 - 1
nt2 = mdlVariables.cantidadTemp2 - 1
nt3 = mdlVariables.cantidadTemp3 - 1

'*****
'*****
'Iteraicones

For iteracion = 1 To 20

    For x = 0 To nt1
        fx1(x) = Math.Exp(-1 * ea1 / (R * (temperatura1(x) + 273)))
    Next x
    s(1) = simpson(fx1, nt1)

    For x = 0 To nt1
        fx1(x) = Math.Exp(-1 * ea2 / (R * (temperatura1(x) + 273)))
    Next x
    s(2) = simpson(fx1, nt1)

    For x = 0 To nt2
        fx2(x) = Math.Exp(-1 * ea3 / (R * (temperatura2(x) + 273)))
    Next x
    s(3) = simpson(fx2, nt2)

    For x = 0 To nt2
        fx2(x) = Math.Exp(-1 * ea4 / (R * (temperatura2(x) + 273)))
    Next x
    s(4) = simpson(fx2, nt2)

    For x = 0 To nt1
        fx1(x) = Math.Exp(-1 * ea5 / (R * (temperatura1(x) + 273)))

```

```

Next x
s(5) = simpson(fx1, nt1)

For x = 0 To nt1
    fx1(x) = Math.Exp(-1 * ea6 / (R * (temperatura1(x) + 273)))
Next x
s(6) = simpson(fx1, nt1)

For x = 0 To nt3
    fx3(x) = Math.Exp(-1 * ea7 / (R * (temperatura3(x) + 273)))
Next x
s(7) = simpson(fx3, nt3)

For x = 0 To nt3
    fx3(x) = Math.Exp(-1 * ea8 / (R * (temperatura3(x) + 273)))
Next x
s(8) = simpson(fx3, nt3)

For x = 0 To nt2
    fx2(x) = Math.Exp(-1 * ea9 / (R * (temperatura2(x) + 273)))
Next x
s(9) = simpson(fx2, nt2)

For x = 0 To nt2
    fx2(x) = Math.Exp(-1 * ea10 / (R * (temperatura2(x) + 273)))
Next x
s(10) = simpson(fx2, nt2)

For x = 0 To nt3
    fx3(x) = Math.Exp(-1 * ea11 / (R * (temperatura3(x) + 273)))
Next x
s(11) = simpson(fx3, nt3)

For x = 0 To nt3
    fx3(x) = Math.Exp(-1 * ea12 / (R * (temperatura3(x) + 273)))
Next x
s(12) = simpson(fx3, nt3)
resultado = PEIE(ea1, ea5, ea9, s)

Ene_act(iteracion, 0) = resultado(0)
Ene_act(iteracion, 1) = resultado(1)
Ene_act(iteracion, 2) = resultado(2)

ea1 = resultado(0)
ea2 = ea1 * 2
ea3 = ea1
ea4 = ea2
ea5 = resultado(1)
ea6 = ea5 * 2
ea7 = ea5
ea8 = ea6
ea9 = resultado(2)
ea10 = ea9 * 2
ea11 = ea9
ea12 = ea10

Dim p, q, o As Double

If iteracion > 1 Then
    p = Math.Abs(Ene_act(iteracion, 0) - Ene_act(iteracion - 1, 0))
    q = Math.Abs(Ene_act(iteracion, 1) - Ene_act(iteracion - 1, 1))
    o = Math.Abs(Ene_act(iteracion, 2) - Ene_act(iteracion - 1, 2))

```

```

        If (p < 0.0000001 And q < 0.0000001 And o < 0.0000001) Or
            iteracion = 20 Then
            Exit For
        End If
    End If
Next

'calculos finales

Dim m_y(6) As Double

Dim m_x(6) As Double

For x = 0 To 5
    m_y(x) = Math.Log(r_k(x))
    m_x(x) = 1 / r_te(x) * 1000
Next x

'ponerlos en el formulario 3

ListBox1.Items.Clear()
ListBox2.Items.Clear()
ListBox3.Items.Clear()

For x = 1 To iteracion
    ListBox1.Items.Add(Math.Round(Ene_act(x, 0), 3))
    ListBox2.Items.Add(Math.Round(Ene_act(x, 1), 3))
    ListBox3.Items.Add(Math.Round(Ene_act(x, 2), 3))
Next x
lblIteraciones.Text = iteracion

ListBox4.Items.Clear()
ListBox5.Items.Clear()

For x = 0 To 5
    ListBox4.Items.Add(Math.Round(m_x(x), 3))
    ListBox5.Items.Add(Math.Round(m_y(x), 3))
Next x

'*****
'Calculando la regresión lineal
'*****

Dim m_xy(6) As Double
Dim m_x2(6) As Double
Dim sx As Double
Dim sy As Double
Dim sxy As Double
Dim sx2 As Double

For x = 0 To 5
    m_xy(x) = m_x(x) * m_y(x)
    m_x2(x) = m_x(x) * m_x(x)
Next x

sx = 0
sy = 0
sxy = 0
sx2 = 0

```

```

For x = 0 To 5

    sx = sx + m_x(x)
    sy = sy + m_y(x)

    sxy = sxy + m_xy(x)
    sx2 = sx2 + m_x2(x)

Next x

Dim a As Double
Dim b As Double

a = (6 * sxy - sx * sy) / (6 * sx2 - sx * sx)
b = (sy - a * sx) / 6

mdlVariables.regLineal = Format(b, "0.000") & " + " & Format(a, "0.000") & "x"

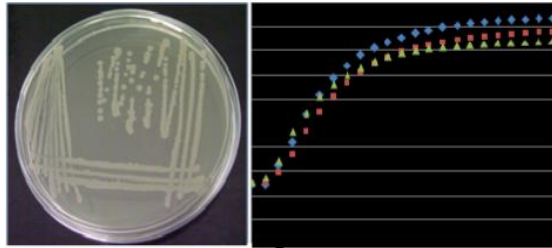
Dim ko, ea As Double
ko = Math.Exp(b)
ea = Math.Abs(a) * 8.3145

mdlVariables.k0 = ko

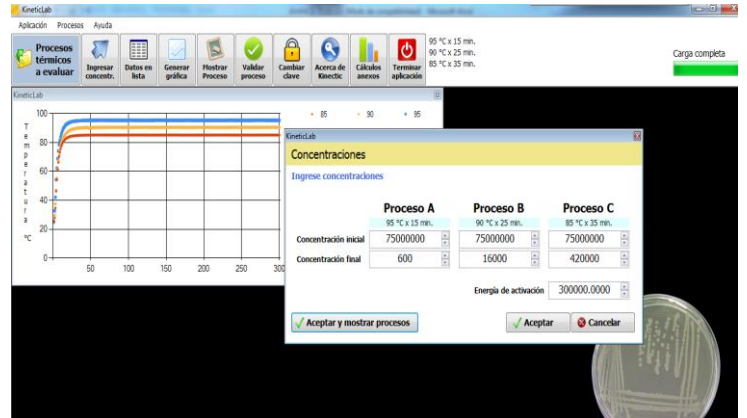
mdlVariables.energiaActivacionFinal = ea

    End Sub
End Class

```



$$G = \int_{t_0}^t e^{\left\{ \frac{-Ea}{R \cdot T(t)} \right\}} dt$$



# MANUAL DEL USUARIO

# Índice

<b>1. Introducción</b>	
1.1 Qué es <i>KineticLab</i> ?	3
1.2 Por qué es importante <i>KineticLab</i> ?	3
<b>2. Inicio</b>	
2.2 Instalación	3
2.3 Desinstalación	4
<b>3. Área de Trabajo <i>KineticLab</i></b>	
3.1 Ingreso a la aplicación	4
3.2 Iniciar Sistema	5
3.3 Ingreso de datos	5
3.4 Ingreso de Concentraciones	6
3.5 Visualización de Resultados	7
3.5.1 Procesos	
a. Iteraciones	7
b. Regresión lineal	8
c. Cálculo de $k$ y $D$	9
d. Validación	9
3.6 Opciones de la barra del menú principal	
3.6.1 Datos lista	10
3.6.2 Generar Gráfica	11
3.6.3 Acerca de <i>KineticLab</i>	12
3.6.4 Cambiar de clave	12
3.6.5 Terminar aplicación	13



## 1. Introducción

En este documento se describen los objetivos e información de cómo utilizar el programa *KineticLab*. Es de suma importancia consultar este manual antes de operar el software, ya que lo guiará paso a paso en el manejo de sus funciones. Con el fin de facilitar la comprensión se incluyen gráficos de las ventanas del programa.

Este manual fue elaborado para ayudar a los analistas y laboratoristas con poca experiencia en informática, como instalar y configurar el software requerido por los programas y aplicativos del entorno Visual Studio. Las dos primeras partes explican cómo instalar y configurar *KineticLab*. La tercera parte está orientada al desarrollo del método matemático PEIE, dentro del programa.

### 1.1 Qué es *KineticLab*?

El software *KineticLab*, cuyo nombre deriva de las palabras en inglés “cinética” y “laboratorio”, calcula los siguientes parámetros cinéticos:  $k_0$ ,  $E_a$ ,  $D$  y  $z$ , a partir de ensayos de tratamiento térmico (tiempo – temperatura) previamente efectuados en el laboratorio. Este programa fue desarrollado en base al método matemático PEIE (Paired Equivalent Isothermal Exposure, Welt et al., 1997a).

### 1.2 Por qué es importante *KineticLab*?

*KineticLab* fue planteado como una herramienta de fácil uso; ante las dificultades para determinar parámetros cinéticos a temperatura constante y debido a que el calentamiento del alimento no es instantáneo, como es el caso de sólidos o mezclas sólido - líquido. Los parámetros  $k_0$ ,  $E_a$ ,  $D$  y  $z$ , obtenidos pueden ser calculados en función a la muerte de microorganismos, inactivación de enzimas y/o pérdida de componentes lábiles.

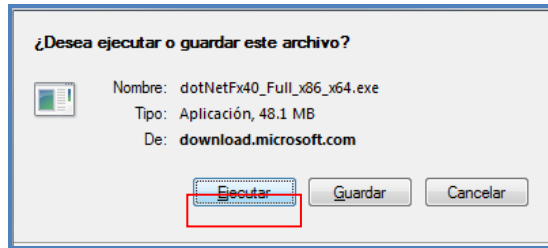
## 2. Inicio

### 2.1 Instalación

*KineticLab* fue desarrollado en el lenguaje de programación Visual Basic .Net 2010 por lo que requiere del .Net **Framework 4.0** (imprescindible para ejecutar y controlar un proyecto en Visual Studio 2010). Además se presentará la opción de instalar un ícono de acceso directo a *KineticLab* en el menú Inicio o sobre su escritorio, según requiera el usuario.



Si tiene una conexión a Internet puede descargar el programa de instalación **Framework 4.0** desde:

[http://download.microsoft.com/download/9/5/A/95A9616B-7A37-4AF6-BC36-D6EA96C8DAAE/dotNetFx40\\_Full\\_x86\\_x64.exe](http://download.microsoft.com/download/9/5/A/95A9616B-7A37-4AF6-BC36-D6EA96C8DAAE/dotNetFx40_Full_x86_x64.exe)

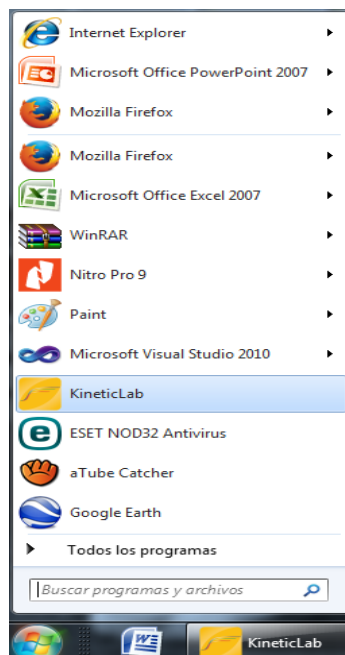


Instale **Framework 4.0** en el sistema operativo **Windows** del ordenador, a partir de este paso la instalación de *KineticLab* se realizará de manera sencilla con su archivo de creación.

La instalación del programa se realizará, de preferencia, de la siguiente manera:

Descargar el instalador y ejecutar  **setup.exe**, Luego siga todas las instrucciones sugeridas. La instalación correcta del sistema deberá generar el icono de *kineticLab*  como acceso directo en el escritorio de la computadora. También corresponderá la siguiente configuración:

**C:\Program Files\José Casas Vasquez\KineticLab\**




## 2.2 Desinstalación

- Seleccione **Configuración > Panel de control** desde el menú **Inicio**.
- Haga doble clic sobre el ícono **‘Agregar o quitar programas’**.
- Seleccione *KineticLab* de la lista de aplicaciones.
- Haga clic en **‘Agregar o quitar’** y siga las instrucciones que aparezcan en la pantalla.

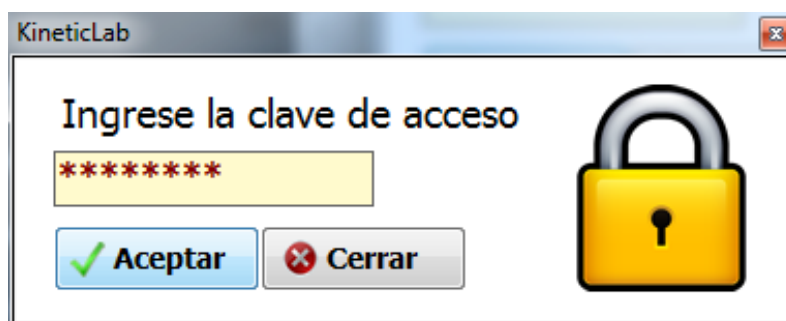
## Área de Trabajo *KineticLab*

### 3.1 Ingreso a la aplicación

Desde la barra de tareas de Windows seleccione el comando **Inicio**, luego desde el grupo de programas seleccione el ítem ***KineticLab***. También se podrá ingresar desde el escritorio, si es que se ha instalado el icono de acceso directo . Una vez hechas las selecciones se activa la aplicación.

### 3.2 Iniciar Sistema

Al iniciar el sistema se presenta la ventana de identificación de usuario, en la cual se debe ingresar la contraseña de acceso al sistema, como se muestra a continuación:



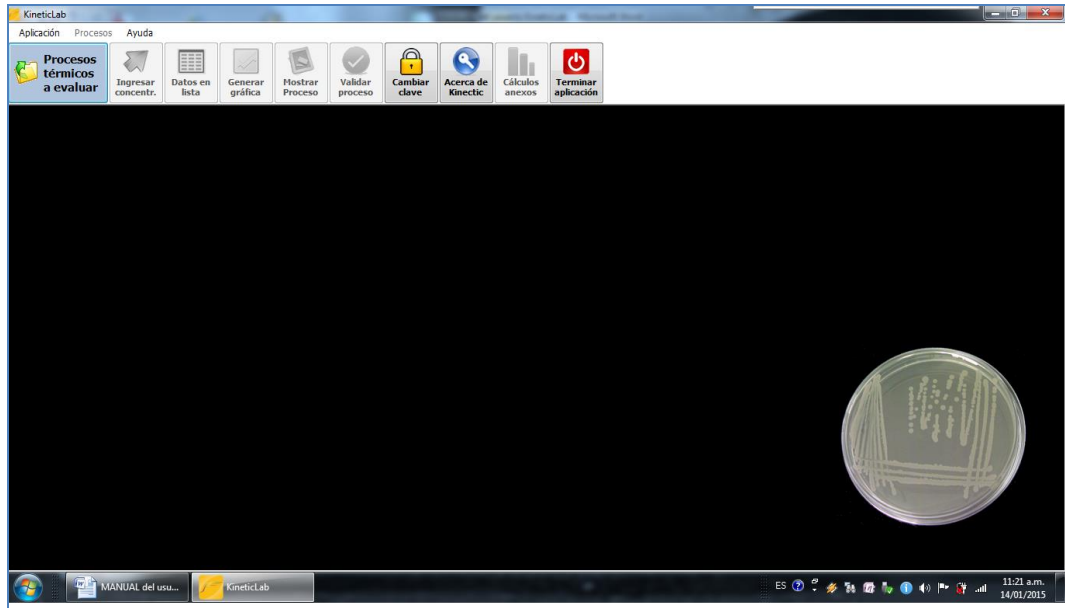
**Ingrese la clave de acceso:** Ingrese en esta área la contraseña de acceso al sistema (en minúsculas).

**Clave de acceso:** **kinetic**.

**Aceptar:** Haga un clic con el botón izquierdo del mouse sobre este comando para confirmar la operación.

**Cerrar:** Haga un clic con el botón izquierdo del mouse sobre este comando para cerrar la operación.

Con la clave de acceso seleccionada aparecerá lo siguiente en la pantalla:

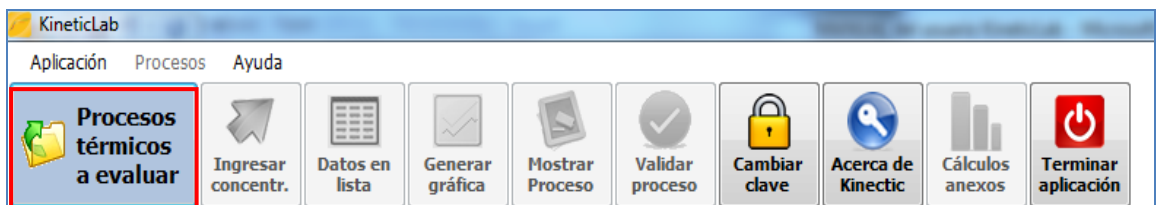


### 3.3 Ingreso de datos

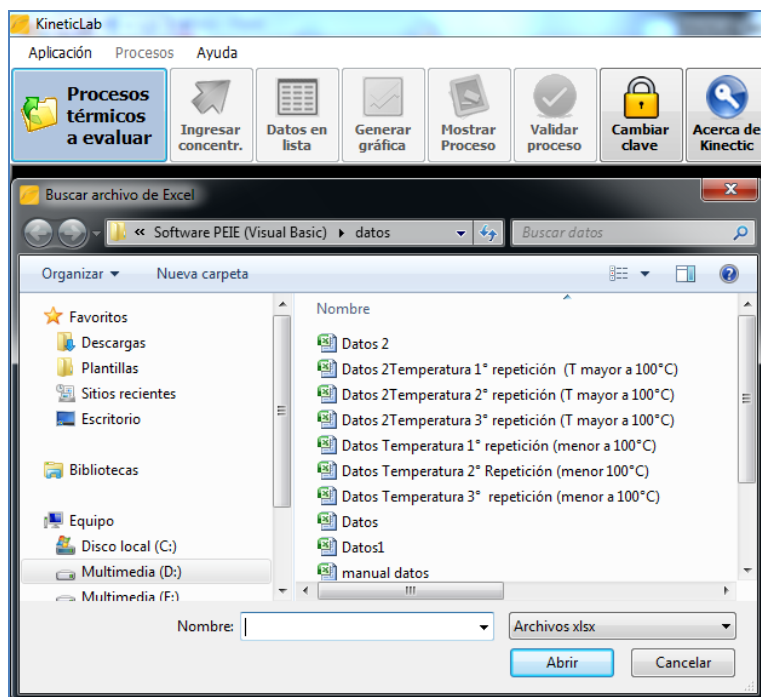
El software *KineticLab* necesita estrictamente de tres datos de entrada, para su correcto funcionamiento, estos son:

- ✓ Historia térmica de los procesos (tiempo – temperatura)
- ✓ Concentración de microorganismos y
- ✓ Elección de energía de activación.

Como primer paso, el programa muestra la pantalla vacía, con el botón “**Procesos térmicos a evaluar**” *activado* (sombreado) en la parte superior.

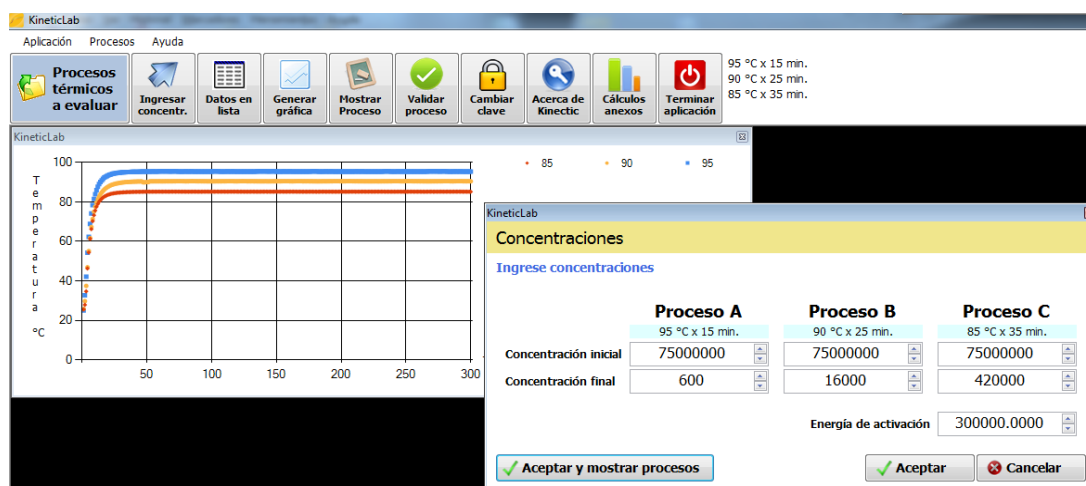


Al hacer *clic* sobre el botón “**Procesos térmicos a evaluar**” el programa presentará una ventana de búsqueda de archivos, para seleccionar los datos guardados de tiempo - temperatura (historia térmica). Este registro de temperatura en función del tiempo estará almacenado (en un **formato único** para todos los archivos de Excel) de tal forma que pueda ser leído por el software *KineticLab*. Los datos de temperatura - tiempo deberán estar en una sola hoja de cálculo de nombre “**datos**”.



### 3.4 Ingreso de la Concentración de microorganismos

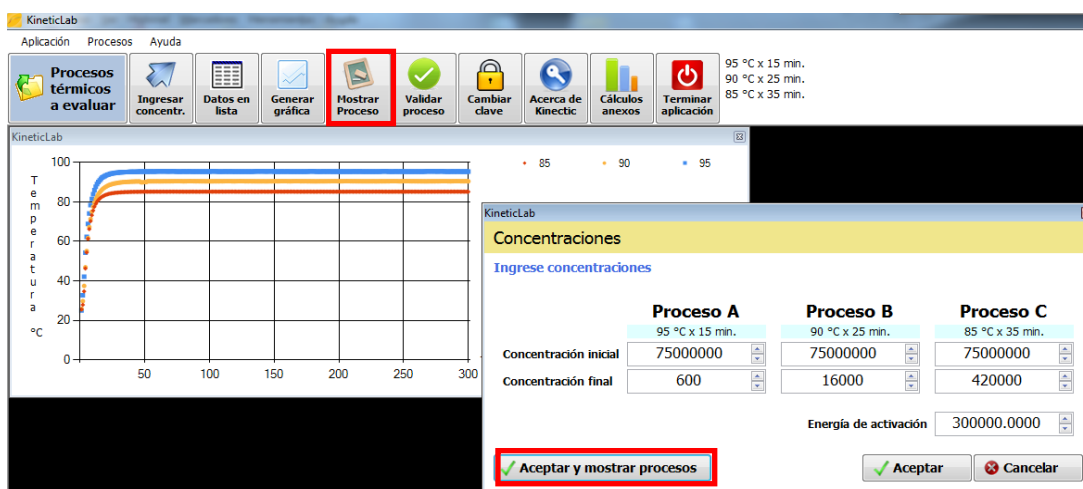
Una vez seleccionados los datos de temperatura provenientes de Excel, automáticamente el programa presentará una grafica de referencia y la ventana “**Concentraciones**” con la temperatura y el tiempo utilizados para cada proceso térmico. A continuación se deberán ingresar la concentración inicial y final (números enteros) para cada proceso, además de asignar el primer valor de la **energía de activación**, como se muestra en la siguiente ilustración:



### 3.5 Visualización de resultados

A partir de la digitación de los datos de entrada (Temperaturas, Concentración y Energía de activación inicial) en el formulario “**Concentraciones**” el programa podrá reportar los Procesos: Iteraciones, Regresión lineal, Parámetros cinéticos y Progreso de las iteraciones. A los cuales se podrán acceder de 2 maneras: a través

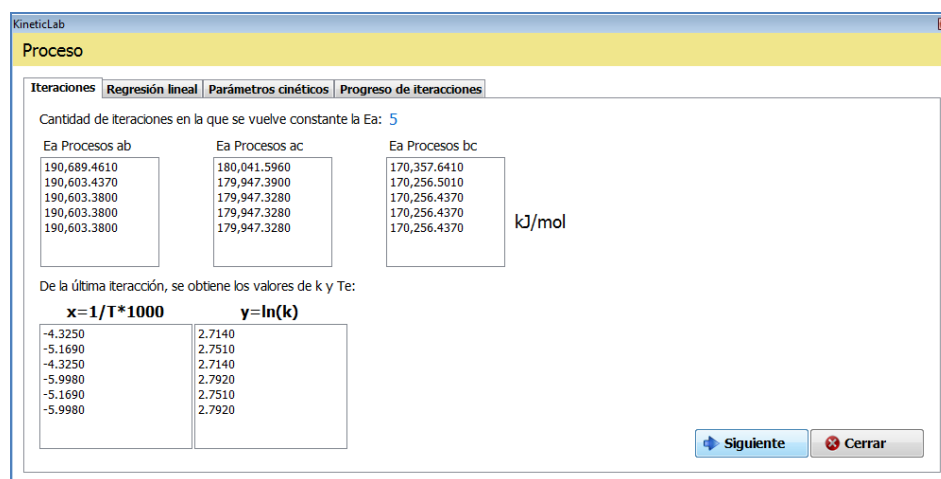
de los botones que se encuentran en la parte superior de la pantalla principal y de forma secuencial cuando se ingresan las concentraciones mediante el botón aceptar y mostrar procesos.



### 3.5.1 Procesos

#### a. Iteraciones

El formulario Procesos contiene 4 fichas o pestañas (Iteraciones, Regresión lineal, Parámetros cinéticos y Progreso de iteraciones). La primera en exponerse de forma automática es “**iteraciones**” que mostrara el número de iteraciones que el programa efectuó, también a través de cuadros se presentan la evolución de la Ea, para cada par de procesos (Método PEIE), y los valores para la regresión lineal final:



#### b. Regresión lineal

La segunda ficha a la que se puede acceder, haciendo *clic* en el botón “siguiente”, es “**Regresión Lineal**”. Aquí se podrá observar la ecuación lineal final y su respectiva formula para hallar los primeros parametros cinéticos:  $k_0$  y  $E_a$ .

KineticLab

Proceso

Iteraciones **Regresión lineal** Parámetros cinéticos Progreso de iteraciones

$y = a - bx$

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

Ko

Ea  kJ/mol

### c. Parámetros cinéticos

En esta ventana se podrá visualizar los parámetros cinéticos  $k^T$  (constante de velocidad isotermica) y  $D^T$  (tiempo de reducción termica). Para esto se ingresará la temperatura de la cual se quiere saber su espectivo valor  $k$  y/o  $D$ . Es importante saber que los datos de temperatura deberan ser en grados centigrados ( $^{\circ}\text{C}$ ) y deberan estar dentro del rango de las temperaturas de los procesos termicos evaluados. Los resultados se mostraran secuencialmente:

KineticLab

Proceso

Iteraciones Regresión lineal **Parámetros cinéticos** Progreso de iteraciones

Temp. en $^{\circ}\text{C}$	D en seg.	D en min.	Log (D)	K (1/min)
<input type="text" value="95"/>	<input type="text" value="188.62"/>	<input type="text" value="3.144"/>	<input type="text" value="0.497"/>	<input type="text" value="0.733"/>
<input type="text" value="90"/>	<input type="text" value="428.098"/>	<input type="text" value="7.135"/>	<input type="text" value="0.853"/>	<input type="text" value="0.323"/>
<input type="text" value="85"/>	<input type="text" value="971.627"/>	<input type="text" value="16.194"/>	<input type="text" value="1.209"/>	<input type="text" value="0.142"/>

z   $^{\circ}\text{C}$

### d. Progreso de iteraciones

Es la última ficha del formulario “Procesos”, y muestra el progreso de las iteraciones que el programa calcula internamente. En la pantalla se observará, en la parte superior; los valores de  $K_0$  y la  $E_a$  para cada iteración (hasta volverse constantes) y en la parte inferior se muestra la comparación entre la  $C/C_0$  real y lo que va calculando el programa.

The screenshot shows the 'Proceso' window in KineticLab. It contains two tables. The first table, titled 'Predicción de iteraciones', shows predicted values for parameters  $k_0$  and  $E_a$  across five iterations. The second table shows the results for three processes (a, b, c) and the SSQ Error across five iterations.

Predicción de iteraciones						
	1	2	3	4	5	
$k_0$	4.152990E+0...	4.032035E+0...	4.031951E+0...	4.031951E+0...	4.031951E+0...	
$E_a$	179.881425	179.795161	179.795100	179.795099	179.795099	

Procesos	C/Co real	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.	Iterac.
a	0.000008	0.000009	0.000010	0.000010	0.000010	0.000010
b	0.000213	0.000161	0.000163	0.000163	0.000163	0.000163
c	0.005600	0.006026	0.006044	0.006044	0.006044	0.006044
	SSQ Error	1.84181E-07	1.9964E-07	1.9964E-07	1.9964E-07	1.9964E-07

### 3.6 Opciones de la barra del menú principal

En esta barra se encontraran los siguientes botones: “**Procesos térmicos a evaluar**” (por facilidad de uso y necesidad es el primero en estar activo, el uso de este botón ya se detalló en la parte 3.3 Ingreso de datos), el segundo, de izquierda a derecha, es: “**Ingresar concentraciones**” (el cual fue descrito en la parte 3.4 Ingreso de concentraciones) a esta opción se podrá ingresar de dos formas: automáticamente, luego de enlazar los datos de la temperatura por medio del primer botón o mediante la barra del menú principal. La opción “**Mostrar Procesos**” detalla el desarrollo de las iteraciones, cálculos y resultados de los parámetros cinéticos. Se detalla su funcionamiento en el apartado 3.5.1 Proceso y al igual que los dos botones anteriores se puede ingresar de dos formas: como paso siguiente de la ventana concentraciones o por la barra del menú principal. Los siguientes botones de la barra si se desarrollan de forma independiente y se muestran a continuación

#### 3.6.1 Datos lista

Este botón muestra la totalidad de datos de temperatura de los tres procesos térmicos, indicando el número de datos por proceso:



Procesos térmicos a evaluar

Ingresar concentr.

**Datos en lista**

Generar gráfica

Mostrar Proceso

Acerca de Kinetic

Cambiar clave

Terminar aplicación

Titulo

Temperaturas

Temperatura 1 **91**    Temperatura 2 **181**    Temperatura 3 **301**

Número	Temperatura 1	Temperatura 2	Temperatura 3
1	26.618162	22.380033	24.004414
2	26.894251	23.249389	24.293053
3	28.777759	24.682985	26.041484
4	31.041917	26.599746	27.824953
5	33.544232	28.748738	29.638769
6	35.998974	31.102292	31.437339
7	38.516627	33.56697	33.293751
8	41.007546	36.013893	35.102832
9	43.503326	38.522136	36.89532
10	46.009222	40.978448	38.576002
11	48.455611	43.321654	40.275001
12	50.839947	45.640571	41.969797
13	53.148157	47.843364	43.582652
14	55.336343	50.003632	45.141562
15	57.480552	52.078099	46.725914
16	59.522493	54.116473	48.222703

Cerrar

### 3.6.2 Generar Gráfica

Para observar la gráfica de las curvas del registro de temperatura de los tres procesos térmicos seleccione el botón “Generar gráfica”, automáticamente se accionará una ventana en la cual se deberá accionar “Graficar”:

KineticLab

Aplicación    Procesos    Ayuda

Procesos térmicos a evaluar

Ingresar concentr.

Datos en lista

**Generar gráfica**

Mostrar Proceso

Validar proceso

Cambiar clave

Acerca de Kinetic

Cálculos anexos

Terminar aplicación

95 °C x 15 min.  
90 °C x 25 min.  
85 °C x 35 min.

KineticLab

Temperatura °C

100  
80  
60  
40  
20  
0

85    90    95

0    50    100    150    200    250    300

Tiempo (segundos)

Cerrar

### 3.6.3 Acerca de *KineticLab*

Este botón presenta las características propias del *software*:



### 3.6.4 Cambiar clave

Este botón presenta la opción de cambiar la clave inicial del *software KineticLab*, para lo cual primero se deberá digitar la clave actual (como medida de seguridad) para seguidamente en la parte inferior digitar la nueva clave. Para verificar si el cambio ha sido producido se deberá reiniciar el programa y probar la nueva clave al inicio.



### 2.6.5 Terminar aplicación

Al final de la barra de menú se muestra el botón “**Terminar aplicación**”, el cual si es seleccionado presentará una ventana con la siguiente pregunta: “**Desea salir?**” si la decisión es terminar la aplicación se optará por el botón **Sí**, pero si se desea continuar utilizando el programa seleccionar **No**.

