



industriales  
etsii

Escuela Técnica  
Superior  
de Ingeniería  
Industrial

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

## Diseño óptimo de experimentos de procesos de inactivación microbiológica aplicables a la industria de alimentos.

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍAS INDUSTRIALES



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

**Autor:** José Lucas Peñalver Soto  
**Director:** José Alberto Egea Larrosa  
**Codirector:** Alberto Garre Pérez

Cartagena, Julio 2016



## **Agradecimientos**

En primer lugar agradecer a José Alberto Egea Larrosa la oportunidad de realizar este proyecto y por liderarlo tan bien. A Alberto Garre Pérez por guiarme en cada momento y al Departamento de Ingeniería de los Alimentos y el Equipamiento Agrícola de la Escuela de Ingeniería de Agrónomos de la Universidad Politécnica de Cartagena por su participación en el proyecto.

A mi familia y amigos, en especial a mis padres, hermanos y abuelos, por todo el apoyo recibido durante estos 4 años.



## Contenido

1. Introducción .....	5
2. Materiales y métodos .....	8
2.1. Diseño óptimo de experimentos .....	8
2.1.1. Funciones de Sensibilidad Locales (y su cálculo numérico).....	11
2.1.2. DOE basado en la FIM. Diferentes criterios. ....	12
2.1.3. Matriz de correlación de las funciones de sensibilidad local. ....	14
2.2. Métodos de optimización .....	15
2.3. Lenguaje R y paquetes utilizados .....	16
3. Aplicación del diseño óptimo de experimentos a inactivación microbiana. ....	20
3.1. Modelos de inactivación.....	20
3.2. Microorganismo analizado .....	22
3.3. Condiciones experimentales.....	26
3.4. Metodología para el diseño óptimo de inactivación microbiana.....	28
4. Resultados. ....	29
4.1. Funciones de sensibilidad.....	29
4.2. Diseño óptimo sin penalti (criterio D y E modificado). ....	32
4.3. Diseño óptimo con penalización. ....	37
4.3.1. Análisis del diseño de experimentos para el perfil de temperatura en rampa. ....	40
4.3.2. Análisis del diseño de experimentos para el perfil de temperatura triangular.....	41
4.3.3. Discusión de los resultados. ....	43
5. Conclusiones .....	48
6. Bibliografía .....	51
7. Apéndices.....	53

## Índice de Figuras

Figura 1. Proceso iterativo del calibrado de modelos.....	5
Figura 2: Interpretación geométrica de varios criterios de diseño óptimo (Rodríguez-Fernández, 2006) .....	14
Figura 3. Número de paquetes de R disponibles .....	18
Figura 4. Experimentos de Bigelow y Esty (Palop Gómez, 2014).....	20
Figura 5. Distribución de Weibull (Palop Gómez, 2014).....	22
Figura 6. <i>L. monocytogenes</i> .....	23
Figura 7. Vigilancia de <i>L. monocytogenes</i> entre 2008 y 2013. Casos notificados. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica Informe Anual. Año 2013. ....	25
Figura 8. Vigilancia de <i>L. monocytogenes</i> , 2013. Casos por grupos de edad y sexo. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica Informe Anual. Año 2013. ....	25
Figura 9. Curva de inactivación para el perfil de temperatura en rampa.....	27
Figura 10. Curva de inactivación para el perfil de temperatura triangular.....	27
Figura 11. Funciones de sensibilidad locales para el perfil de temperatura en rampa. En línea discontinua se muestra la curva de inactivación para este perfil. ....	30
Figura 12. Función de Sensibilidad para el perfil de temperatura triangular. ....	30
Figura 13. Resultados del análisis de identificabilidad a priori para el perfil de temperatura en rampa. ....	31
Figura 14. Resultados del análisis de identificabilidad a priori para el perfil de temperatura triangular.....	32
Figura 15. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarraqe para el perfil en rampa.....	33
Figura 16. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura en rampa. ....	34
Figura 17. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarraqe para el perfil triangular.....	35
Figura 18. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura triangular. ....	35
Figura 19. Densidad de probabilidad de las soluciones para el criterio D. ....	36
Figura 20. Densidad de probabilidad de las soluciones para el criterio E-modificado. .	36
Figura 24. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarraqe para el perfil en rampa con penalización.....	40
Figura 25. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura en rampa con penalización (eliminadas simulaciones sin convergencia). ....	41

Figura 26. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarranque para el perfil triangular con penalización.....	42
Figura 27. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura triangular con penalización (eliminadas simulaciones sin convergencia). .....	42
Figura 28. Solución criterio D para perfil en rampa.....	46
Figura 29. Solución criterio E modificado para perfil en rampa. ....	46
Figura 30. Solución criterio D para perfil triangular. ....	47
Figura 31. Soluciones criterio E modificado para el perfil triangular .....	47

## Índice de Tablas

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> (FSAI, 2005) .....	24
Tabla 2. Porcentaje de experimentos que no cumplen la restricción. ....	37
Tabla 3. Resultados para funciones de penalización. ....	39
Tabla 4. Valores de función objetivo para los criterios D y E modificado para ambos perfiles de temperatura en un diseño equiespaciado .....	44
Tabla 5. Resultados del diseño óptimo de experimentos y su comparación con un diseño equiespaciado. Criterio D. ....	44
Tabla 6. Resultados del diseño óptimo de experimentos y su comparación con un diseño equiespaciado. Criterio E modificado. ....	44
Tabla 7. Solución de tiempos para el experimento.....	45



## 1 Introducción

Un modelo matemático es una simplificación de la realidad, normalmente motivado por una aplicación real, que se traduce a un lenguaje formal (el modelo), se resuelve y después se debe interpretar para comprender el fenómeno real. Como dijo el estadístico británico G.E.P. Box "*todos los modelos son erróneos, pero algunos son útiles*" (Box, 1976) y es el espíritu de esta frase el que lleva a muchos científicos a utilizar herramientas matemáticas para intentar explicar los fenómenos de estudio de sus investigaciones.

En muchas ocasiones, estos modelos matemáticos tienen unos parámetros desconocidos de antemano que dependen del caso estudiado, de forma que es necesario ajustarlos a partir de experimentos para poder hacer predicciones (Walter & Pronzato, 1997). Relacionado con esto surgen tareas como la estimación de parámetros (o calibrado de modelos) y el diseño óptimo de experimentos (Banga & Balsa-Canto, 2008), que forman parte del procedimiento iterativo del proceso de modelado matemático en el que, una vez propuesto un modelo, se tienen unos parámetros nominales para el mismo mediante el ajuste de unos datos experimentales iniciales. Posteriormente este modelo ajustado se usa para realizar un diseño óptimo de experimentos, con el que se realizarán medidas de mayor calidad que permitirán un nuevo ajuste de los parámetros, pudiendo repetirse el proceso de forma iterativa. Este ciclo viene representado en la Figura 1.

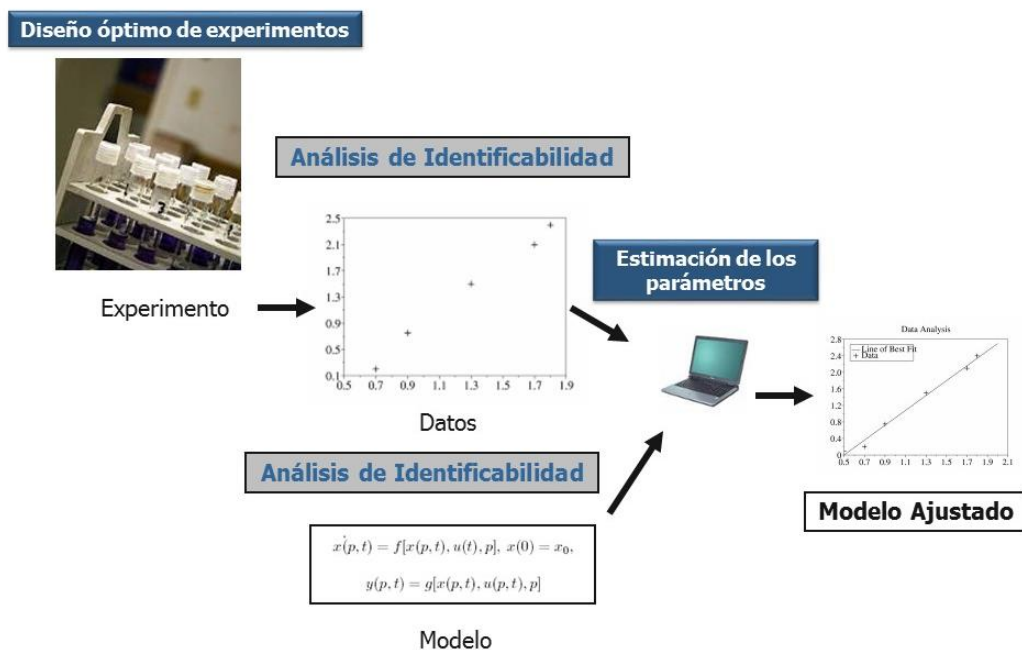


Figura 1. Proceso iterativo del calibrado de modelos

En el campo de la ingeniería de alimentos el modelado matemático es fundamental para la optimización y el control de los procesos, asegurando así unos estándares de calidad, de nutrición y de seguridad que son especialmente rigurosos dada la importancia que tiene dicho campo sobre la salud (Sablani, Datta, Rahman, & Mujumdar, 2006) (Datta, 2016)

Centrándonos en el ámbito de la seguridad alimentaria, la seguridad microbiológica de los alimentos ha sido garantizada durante las últimas décadas por medio de la aplicación de tratamientos térmicos de inactivación (Deak, 2013). Sin embargo, este tipo de tratamiento no sólo ataca a las poblaciones patógenas, sino que también reduce las propiedades organolépticas y sensoriales del producto.

Debido al desconocimiento de la respuesta del microorganismo a inactivar al tratamiento aplicado, dichos tratamientos han sido tradicionalmente conservadores. En consecuencia, la calidad del producto final se reducía innecesariamente, y el coste del proceso se incrementaba debido a la energía necesaria para producir el calentamiento.

La demanda de productos mínimamente procesados ha venido en aumento durante los últimos años (Siddiqui & Rahman, 2015) . Todo parece indicar que esta tendencia se mantendrá e incluso aumentará. Esto supone un reto para la industria alimentaria, ya que para ello es necesario determinar el tratamiento térmico óptimo que reduzca las poblaciones microbianas patógenas a niveles aceptables manteniendo una calidad del producto máxima, al tiempo que se reduzcan los costes operacionales.

La microbiología predictiva (Fernando & Antonio, 2013) juega un papel clave en este aspecto. Esta ciencia se encarga de describir, por medio de modelos matemáticos, el comportamiento de las poblaciones microbianas bajo condiciones ambientales dadas. Este tipo de modelos pueden ser utilizados para describir el comportamiento de la población microbiana durante el tratamiento térmico aplicado.

Los modelos de inactivación comúnmente utilizados presentan una serie de parámetros que dependen de factores tales como el tipo de microorganismo o el medio de cultivo empleados. Actualmente no existen técnicas para determinar estos parámetros analíticamente, sino que es necesario ajustarlos mediante datos experimentales. La realización de los experimentos necesarios para obtener estos datos suelen ser costosos, ya que necesitan personal altamente cualificado y material y equipamiento específico; de ahí la necesidad diseñar tales experimentos de forma óptima, obteniendo así la máxima información de los datos con la mínima cantidad de trabajo experimental.

El presente trabajo tiene como objetivo el diseño óptimo de experimentos de un proceso de inactivación microbiológica que será primeramente calibrado a partir de unos datos experimentales. Este proceso es fundamental ya que la estimación de los parámetros del modelo matemático depende de la calidad de estos datos experimentales que influyen en la eficiencia del ajuste.

Tradicionalmente, la forma de tomar estos datos sigue un esquema factorial, tomando medidas equiespaciadas en el tiempo y en las condiciones ambientales. El problema de obtener datos experimentales de calidad no es trivial y requiere de herramientas matemáticas que analicen la estructura del modelo matemático para predecir qué medidas realizar y cómo hacerlo, por lo que se trata de un proceso crítico que además es costoso en tiempo y/o dinero.

En el caso que trata este estudio, uno de los procesos habituales para inactivar microorganismos es la aplicación de tratamientos térmicos suaves. Así, el objetivo primordial a abordar en el trabajo es estudiar cuáles son las políticas óptimas de calentamiento a utilizar para maximizar la calidad de los datos experimentales en estos procesos y obtener así la máxima información del modelo, lo que resultará en una caracterización del microorganismo y en una realización de predicciones con incertidumbre mínima.

De esta forma, el trabajo en primer lugar presenta la metodología utilizada. A continuación, se explica en qué consiste el diseño óptimo de experimentos. Para ello se introducen conceptos como función de sensibilidad, diseño óptimo de experimentos (basado en la matriz de información de Fisher) y de optimización, junto con los métodos numéricos utilizados. Una vez desarrollado el contenido matemático que sustenta el trabajo se introduce la herramienta de cálculo utilizada para el desarrollo de los cálculos y a continuación se expone la aplicación del diseño óptimo de experimentos a la inactivación de microorganismos. El trabajo finaliza con una serie de conclusiones y pasos a seguir en el futuro como continuación de los resultados obtenidos.

## 2 Materiales y métodos

El trabajo realiza un estudio cuantitativo experimental que tiene como objetivo fundamental desarrollar un diseño óptimo de experimentos, de tal forma que se consigan ajustar los parámetros del modelo matemático utilizado para describir el proceso, obteniendo la máxima información posible para así conseguir unas predicciones con mínimas incertidumbres. El microorganismo sobre el que se desarrolla la investigación es la *Listeria monocytogenes*.

El problema del diseño de experimentos consiste en la optimización de una función escalar de la matriz de información de Fisher (FIM), que se introducirá más adelante, evaluada en los parámetros nominales. Estos parámetros nominales han sido obtenidos en un ensayo experimental en el laboratorio del Departamento de Ingeniería de los Alimentos y el Equipamiento Agrícola de la Universidad Politécnica de Cartagena. El diseño de experimentos ha sido realizado para dos perfiles de temperaturas distintos y han sido utilizados métodos de optimización locales. Todo el desarrollo de cálculos ha sido elaborado con el software R (R-Core Team, 2012).

### 2.1 Diseño óptimo de experimentos

El diseño óptimo de experimentos (DOE) consiste en encontrar los puntos donde medir con el objetivo de obtener una estimación de los parámetros óptima desde el punto de vista informacional. El DOE se basa en la influencia que tienen los parámetros en el modelo. El análisis de sensibilidad identifica y cuantifica esta influencia.

La realización de experimentos es una actividad muy costosa en tiempo y dinero, especialmente a nivel industrial. Por estos motivos, el diseño óptimo de experimentos es una tarea fundamental que permite localizar las observaciones del experimento a realizar para que los parámetros estimados a partir de los datos proporcionados por los mismos sean de la mejor calidad posible.

Asumiendo que la estructura del modelo es correcta y que éste es estructuralmente identificable, el diseño de experimentos ayudará a mejorar la identificabilidad práctica mejorando a su vez el condicionamiento del problema de estimación y facilitando así la tarea de los métodos de ajuste.

Cuando nos enfrentamos a un problema de diseño óptimo, debemos plantarnos las siguientes preguntas:

- ¿Qué medir? Se trata de elegir las variables a medir.
- ¿Dónde medir? Consiste en el problema de la localización de los sensores.
- ¿Cuándo medir? Debemos establecer una estrategia de muestreo.
- ¿Cómo manipular? Se trata de definir cuáles son las posibles variables manipuladas o controles y el tipo de manipulación, es decir, la variación de los controles a lo largo del experimento. En algunos casos también se podrán modificar las condiciones iniciales de ciertas variables.

En primer lugar la estimación de parámetros suele consistir en la minimización de la siguiente función objetivo mediante la elección óptima de los parámetros  $p$ :

$$J(p) = \sum_{i=1}^N (z_i - \tilde{z}_i(p))^T Q_i (z_i - \tilde{z}_i(p)) \quad (1)$$

Donde  $z_i$  y  $\tilde{z}_i(p)$  son, respectivamente, vectores de  $N$  valores medidos y predicciones del modelo a los tiempos  $t_i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ );  $Q_i$  es una matriz cuadrada proporcionada por el usuario de coeficientes de peso.

El valor esperado de la función objetivo para un conjunto de parámetros  $p$  diferentes del óptimo es:

$$E[J(p + \delta p)] \cong \delta p^T \left[ \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial z}{\partial p}(t_i) \right)^T Q \left( \frac{\partial z}{\partial p}(t_i) \right) \right] \delta p + \sum_{i=1}^N \text{tr}(V_i Q) \quad (2)$$

Donde  $V_i$  es la matriz de covarianza del error de las medidas. La matriz  $Q$  es la matriz identidad. Para optimizar la Ecuación (2) es necesario optimizar el término entre corchetes  $[\cdot]$ . Este término se conoce como matriz de información de Fisher (**FIM**) y expresa la cantidad de información de los datos experimentales.

$$\mathbf{FIM} = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial z(t_i)}{\partial p} \right)^T Q \left( \frac{\partial z(t_i)}{\partial p} \right) \quad (3)$$

Los términos  $\partial z/\partial p$  son las funciones de sensibilidad,  $S_j$ , que tienen gran importancia para la evaluación de la identificabilidad ya que son el componente principal de la matriz de Fisher.

Las propiedades de la matriz de Fisher son:

- Es simétrica.
- Es semidefinida positiva.
- Es singular si el número de puntos distintos del diseño es inferior al número de parámetros.

Además la región de confianza que proporciona una evaluación objetiva de la precisión de los parámetros estimados y de su identificabilidad puede ser definida como una función de la matriz de covarianza de los parámetros  $C$  y puede expresarse como:

$$\left\{ p: (p - \hat{p})^T C^{-1} (p - \hat{p}) \leq N_p F^{1-\alpha}_{N_p, N-N_p} \right\} \quad (4)$$

Siendo  $N_p$  el número de parámetros a ajustar y  $F$  el estadístico F de Snedecor.

Para un modelo lineal  $z = py + \epsilon$ , con ruido residual  $\epsilon \sim N(0, \sigma^2 I_q)$ , la matriz de covarianzas puede obtenerse como:

$$C = \sigma^2 [Y^T V^{-1}]^{-1} \quad (5)$$

donde  $Y = [y_1, y_2, \dots, y_N]^T$ .

Para modelos no lineales no hay un modo exacto de obtener la matriz de covarianza. Si se asume que el ruido de las medidas no está correlacionado y que éste sigue una distribución normal con media cero y varianza constante, entonces la matriz de covarianza es igual a la inversa de la FIM.

$$C_J(\hat{p}) = FIM^{-1} \quad (6)$$

En este caso, la inversa de la **FIM** representa la matriz de covarianza del error del estimador objetivo de varianza mínima. Por lo tanto se definen los elipsoides de confianza aproximados como:

$$\left\{ p: (p - \hat{p})^T C_J^{-1} (p - \hat{p}) \leq N_p F^{1-\alpha}_{N_p, N-N_p} \right\} \quad (7)$$

Estas propiedades son las que permiten utilizar la matriz de Fisher para el diseño óptimo de experimentos.

En la práctica el problema del diseño óptimo de experimentos consiste en que los parámetros verdaderos del modelo no son conocidos por lo que debe utilizarse un conjunto de parámetros, llamado conjunto de parámetros nominales,  $p_0$ , que generalmente no coincide con los parámetros verdaderos del proceso,  $p^*$ . Estos parámetros nominales,  $p_0$ , se obtienen a partir de experimentos preliminares o de datos bibliográficos. De este modo, el problema del diseño de experimentos consiste en la optimización de una función escalar de la FIM evaluada en los parámetros nominales,  $p_0$ . Dado que éstos normalmente no coinciden con los parámetros verdaderos, se debe realizar un esquema iterativo de diseño para realizar aquellos experimentos que permitan estimar el valor verdadero de los parámetros (o al menos reducir al máximo la incertidumbre sobre ellos). . En cada ciclo iterativo, los valores de los parámetros estimados a partir del experimento precedente son utilizados como conjunto de parámetros nominales para el diseño óptimo de experimentos.

### 2.1.1 Funciones de sensibilidad local (y su cálculo numérico)

El objetivo del análisis de sensibilidad consiste en el estudio de cómo la variación de las salidas de un modelo dependen variaciones en las entradas y de la información que se le proporciona.

Los resultados de un análisis de sensibilidad pueden ser utilizados para:

- Validar un modelo.
- Advertir de comportamientos extraños o no realistas del modelo.
- Sugerir nuevos experimentos o guiar futuros esfuerzos en recolección de datos.
- Indicar supuestos importantes del modelo.
- Guiar la formulación de la estructura del modelo.
- Ajustar valores numéricos para los parámetros.

Los coeficientes de sensibilidad local que forman la matriz de sensibilidad local son las derivadas parciales de las variables del modelo,  $y_i$ , con respecto a los parámetros,  $p_j$ ,

evaluados en el punto de operación o nominal. Por lo tanto, la matriz de sensibilidad juega un papel fundamental en el análisis de probabilidades, estimación de parámetros, optimización y discriminación de modelos.

De esta forma la matriz de sensibilidad ( $S_{ij}$ ) se calcula como:

$$S_{ij} = \left( \frac{\partial y_i}{\partial p_j} \right)_{y=y(t,\hat{p}), p=\hat{p}} \quad (8)$$

El cálculo de las funciones de sensibilidad de modo analítico no siempre es posible, ya que las derivadas parciales de las variables  $y_i$  con respecto a los parámetros  $p_j$  suelen ser desconocidas. De manera que se debe recurrir a diversas aproximaciones (usualmente numéricas) para su cálculo.

La manera más sencilla de calcular sensibilidades locales se trata de variar de forma leve un parámetro y volver a resolver el modelo. Si utilizamos la aproximación por diferencias finitas, los elementos de la matriz de sensibilidades pueden aproximarse por:

$$\frac{\partial y_i(t)}{\partial p_j} \approx \frac{y_i(t, p_j + \Delta p_j) - y_i(t, p_j)}{\Delta p_j} \quad (9)$$

Sin embargo, los valores numéricos obtenidos varían de modo significativo con  $\Delta p_j$ , lo que requiere que se repita la resolución del modelo una vez para cada parámetro como mínimo. Cuando se trata de un modelo no lineal las perturbaciones no pueden ser mayores de un 5% ya que de lo contrario no se cumple la suposición de linealidad local. Como referencia, una perturbación del 1% es un buen valor pero en algunos casos es complicado llegar a ese valor lo que supone un proceso de ensayo y error.

### 2.1.2 DOE basado en la FIM. Diferentes criterios.

Para comparar la eficacia de varios experimentos con respecto a la identificabilidad de los parámetros y a la precisión esperada de la estimación a partir de los datos experimentales, existen varias funciones escalares de la matriz de información de Fisher que se basan en los elipsoides de confianza (Ecuación (7)). Estos resultados también se utilizan como índices de eficacia para el diseño óptimo de experimentos.



Los criterios son:

- **Criterio A: min traza ( $FIM^{-1}$ ):**

El objetivo principal de este criterio se basa en la minimización de la traza y por lo tanto de la suma de los autovalores de la matriz de covarianza, es decir, el cuadrado de la longitud de los ejes de los elipsoides de confianza. Esto se puede entender como minimizar la media aritmética de los errores de los parámetros.

- **Criterio A modificado: max traza (FIM):**

En este caso en vez de minimizar la traza, se maximiza de modo que se evitan los errores numéricos causados durante la inversión de la FIM (usualmente mal condicionada). Sin embargo, este criterio tiene un problema y es que en el máximo puede darse el caso de que la matriz sea singular porque uno de los autovalores sea cero, si alguno de los otros autovalores se ha vuelto lo suficientemente grande. Esto significaría que la región de confianza se va a infinito y que los parámetros no son identificables.

- **Criterio D: max det(FIM):**

Este criterio maximiza el determinante de la FIM, es decir minimiza la media geométrica del error de los parámetros. De esta forma, se minimiza el volumen de los elipsoides de confianza asintóticos y, por lo tanto, la media geométrica del error de los parámetros.

- **Criterio E: min  $\lambda_{\max}$  ( $FIM^{-1}$ ):**

El objetivo es maximizar el mínimo autovalor de la FIM y así minimizar la longitud de los ejes de los elipsoides de confianza. De este modo, este criterio trata de minimizar el mayor de los errores de los parámetros y así maximizar la distancia del caso singular.

- **Criterio E modificado: min  $abs\left(\frac{\lambda_{\max}(FIM)}{\lambda_{\min}(FIM)}\right)$ :**

Este criterio también está relacionado con la forma de la región de confianza. Aquí el objetivo es la minimización del número de condición (relación entre el mayor y el menor autovalor), es decir, trata de igualar el mayor y el menor de los ejes de los elipsoides.

En la Figura 2 se ilustra el significado geométrico de la aplicación de estos criterios.

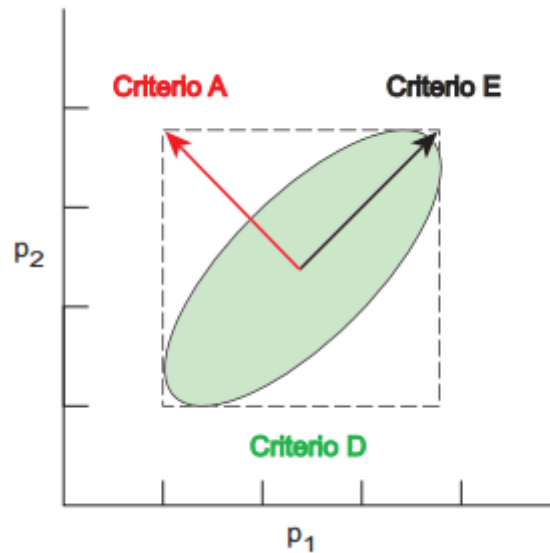


Figura 2: Interpretación geométrica de varios criterios de diseño óptimo (Rodríguez-Fernández, 2006)

Para los cálculos que se realizan se usa el criterio D por ser el más extendido y el E-modificado porque es el que recomienda (Wong, 1994).

Debido a que el cálculo de algunos de los criterios requiere la inversión de la FIM se pueden dar problemas ya que suele estar mal condicionada.

### 2.1.3 Matriz de correlación de las funciones de sensibilidad local.

La matriz de correlación  $\mathbf{R}$ , cuyos elementos son los coeficientes de correlación aproximados entre el parámetro  $i$  y el  $j$ , se define como:

$$R_{ij} = \frac{C_{ij}}{\sqrt{C_{ii}C_{jj}}}, i \neq j, \quad (10)$$

$$R_{ij} = 1, i = j \quad (11)$$

Siendo  $C_{ij}$  la covarianza de los parámetros  $i$  y  $j$ .

La matriz de correlación mide la relación entre los parámetros y da una idea de los efectos de compensación de los cambios en los valores de los parámetros sobre la salida del modelo. Si dos parámetros,  $p_i$  y  $p_j$ , están altamente correlacionados, un cambio en la salida del modelo ocasionado por un cambio en  $p_i$  puede estar (casi) compensado por un

cambio apropiado en el valor de  $p_j$ . Esto evita que los parámetros sean identificables de forma única incluso si la salida del modelo es muy sensible a los cambios en los parámetros individuales.

## 2.2 Métodos de optimización

El proceso de optimización consiste en encontrar la mejor solución del conjunto de todas las posibles de una forma eficiente.

Tanto en el caso de estimación de parámetros como en el de diseño óptimo de experimentos, el objetivo es encontrar el valor de un vector de variables que proporciona el mínimo valor de una función objetivo  $J$ . En el caso de la estimación de parámetros, las variables son los parámetros del modelo a estudiar. De forma que, para modelos dinámicos no lineales como los tratados en este trabajo, se planteará un problema de optimización no lineal que requiere la resolución de un problema de valor inicial para cada evaluación de la función objetivo. Los métodos de optimización numérica generan nuevos valores para las variables de decisión en cada iteración de modo que éstos disminuyan el valor de la función objetivo. La generación de nuevos valores se realiza habitualmente de acuerdo con (Nocedal & Wright, 2006):

$$p_{i+1} = p_i + \alpha d_i \quad (12)$$

donde  $d_i$  es una dirección de búsqueda basada en información acerca de la función objetivo  $J(p)$  adquirida en iteraciones previas y  $\alpha$  es una constante positiva determinada de modo que se obtenga una disminución apropiada del valor de  $J(p)$ . La forma de calcular  $d_i$  determina el tipo de método de optimización. En una primera clasificación, los métodos de optimización pueden dividirse en deterministas, estocásticos e híbridos.

Los métodos deterministas requieren, en muchos casos, el cálculo del gradiente y del hessiano de la función objetivo y suelen buscar la verificación de las condiciones de optimalidad. Dentro de este tipo se puede distinguir entre métodos locales y métodos globales:

- Los métodos locales buscan un vector  $\hat{p}$  tal que  $J(\hat{p}) < J(p)$  para todos los valores de  $p$  cercanos a  $\hat{p}$ .

- En el caso de los métodos globales lo que se pretende es encontrar el valor de  $\hat{p}$  tal que  $J(\hat{p}) < J(p)$  para todos los posibles valores de  $p$ .

Nótese que, en el caso de los problemas convexos, el óptimo local coincide con el global. Por otra parte, los métodos estocásticos calculan las direcciones de búsqueda empleando secuencias, sin hacer uso de información sobre la estructura del problema. En general, son de carácter global aunque debido a su naturaleza aleatoria no se puede garantizar la convergencia al óptimo global con total certeza. A pesar de esto, muchos métodos disponen de pruebas de convergencia asintóticas y a menudo son estrategias muy eficientes localizando las proximidades del óptimo global (Uryasev & Pardalos, 2001).

Los métodos híbridos combinan estrategias estocásticas y deterministas para superar las limitaciones de cada una de ellas mientras que potencian sus puntos fuertes. No obstante, un método híbrido es todo aquél que resulta de la combinación de dos o más algoritmos por lo que también se pueden encontrar estrategias que combinan varios métodos estocásticos o varios métodos deterministas.

La clave para la obtención de métodos híbridos robustos y eficaces consiste en la elección de los métodos a combinar y en el modo de estructurar dicha combinación.

El presente Trabajo Fin de Grado se centra en la estimación de parámetros y el diseño óptimo de experimentos (DOE) de un modelo dinámico no lineal que puede formularse como un problema de optimización no lineal.

Debido a la acusada no linealidad de los modelos considerados, los problemas de calibración y de DOE resultantes serán multimodales por lo que los métodos locales quedarán atrapados en soluciones locales. Para resolver este problema, es necesario usar estrategias de optimización que proporcionen mayor garantía de convergencia a la solución global. En el presente trabajo se utiliza el método multiarranque que consiste en usar el método local de optimización usando diferentes puntos iniciales aleatorios.

### **2.3 Lenguaje R y paquetes utilizados**

R es uno de los lenguajes más utilizados en investigación por la comunidad estadística (R-Core Team, 2012). Es un lenguaje de programación interpretado, de distribución libre,

por lo que los programas R son portables. Es decir, no se compilan para un sistema operativo en particular, sino que se ejecutan paso a paso por un programa que interpreta los comandos del lenguaje.

R fue creado en 1992 en Nueva Zelanda por Ross Ihaka y Robert Gentleman. Su propósito inicial fue desarrollar un lenguaje didáctico. Para ello adoptaron la sintaxis del lenguaje S desarrollado por Bell Laboratories. Este lenguaje, inicialmente fue codificado e implementado como unas bibliotecas de FORTRAN pero posteriormente fue reescrito en lenguaje C por razones de eficiencia. El objetivo de S era desarrollar un lenguaje y un entorno de programación interactivo con capacidad para realizar gráficos. S fue diseñado como un lenguaje interactivo basado en funciones parametrizadas para realizar análisis estadístico y análisis de datos.

S es un lenguaje orientado a los datos y ofrece herramientas de uso general para organizar, almacenar y recuperar distintos tipos de datos. Además, S ofrece métodos numéricos y otras técnicas que facilitan el cálculo y la interpretación de los datos.

Tras la creación de R en 1992, se da un primer anuncio público del software y unos años más tarde en 1995 deciden distribuir R bajo la licencia general de la fundación GNU de software libre y abierto. En 1997 se forma el R Development Core Team y en 2000 sale la versión 1.0. Un año después, en 2001, se publica el primer número de *R-News*. Al año siguiente se crea *The R Foundation for Statistical Computing* y en 2009 el *R-Journal* sustituye a *R-News*. Actualmente el desarrollo de R es responsabilidad del grupo R Development Core Team.

R permite declarar funciones que utilizan expresiones como argumentos, lo que es de gran utilidad cuando se trabaja con modelos estadísticos y gráficos. Además, facilita el desarrollo de funciones de cálculo y tratamiento de datos que se pueden almacenar en nuevos paquetes. Los paquetes de R almacenan funciones y datos. Para que el contenido de un paquete esté disponible, es necesario cargarlo en el entorno de ejecución de R.

Este lenguaje es uno de los diez lenguajes más usados<sup>1</sup> por lo que en estos últimos años se ha convertido en el lenguaje más popular debido a la cantidad de anuncios de empleo que exigen el conocimiento de éste, o la cantidad de artículos de investigación que se publican así como libros o blogs donde se informa. Además un hecho muy indicativo de

---

<sup>1</sup> <http://www.neoteo.com/los-lenguajes-de-programacion-mas-populares/>

que este lenguaje está creciendo consiste el número de paquetes de R disponible (Muenchen, 2016) como se puede observar en la Figura 3.

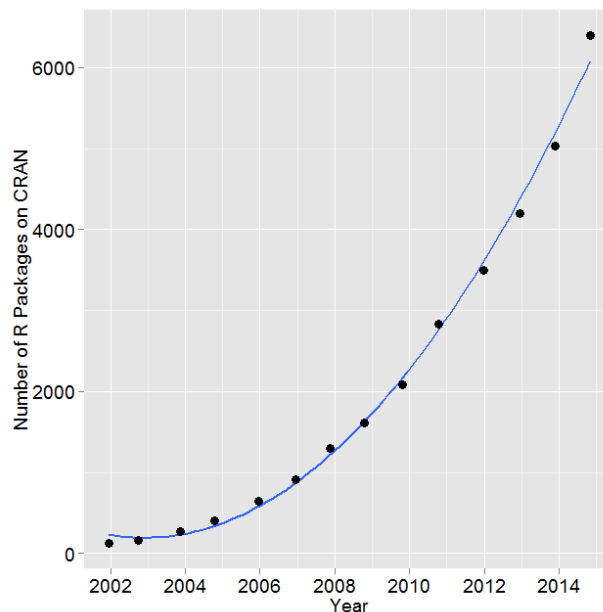


Figura 3. Número de paquetes de R disponibles

Para este trabajo se han utilizado los siguientes paquetes de R:

**-FME (Soetaert & Petzoldt, 2015):**

FME es un paquete para analizar modelos matemáticos que incluye algoritmos de sensibilidad y análisis de Monte-Carlo, identificabilidad de parámetros, modelo con ajuste y proporciona un método que permite estimar los intervalos de confianza de los parámetros. Principalmente, el paquete se centra en los sistemas matemáticos que consisten en ecuaciones diferenciales aunque también puede tratar con otros tipos de modelos.

En nuestro caso el modelo matemático es un sistema dinámico complejo ya que consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas que representan el cambio o variación de la cantidad del microorganismo presente en un determinado tiempo para condiciones ambientales constantes.

Este paquete se basa en los diversos métodos implementados en R para resolver ecuaciones diferenciales tales como, el paquete **deSolve** (Karline, Thomas, & R. Woodrow, 2010) que contiene funciones para integrar problemas de valor inicial de

ecuaciones diferenciales parciales u ordinarias o el paquete **rootSolve** (Soetaert K. , 2009) que le permite hacer análisis de sensibilidad.

Además es muy útil ya que los modelos dependen de parámetros que son desconocidos por lo que es necesario estimarlos a partir de unos datos. Este problema trata por lo tanto de minimizar una medida de la calidad del ajuste que por lo general es una función de mínimos cuadrados o una suma ponderada de los residuos al cuadrado. Además muchos modelos constan de parámetros no identificables que no se pueden determinar con la suficiente precisión por lo que es necesario utilizar algoritmos capaces de converger en una solución con una precisión razonable. Por otra parte, también es necesario proporcionar una estimación de la incertidumbre de los parámetros.

**-Bioinactivation** (Garre, Fernandez, & Egea, 2016):

El paquete de **bioinactivation** implementa funciones para la modelización de la inactivación microbiana. De esta forma, nos permite predecir el proceso de inactivación de una población de microorganismos que son expuestos a un proceso térmico, ya sea isoterma, donde la temperatura se mantiene constante a lo largo del tiempo, o no isoterma. Además, nos permite ajustar los parámetros de diferentes modelos de inactivación a los datos experimentales. Los modelos de inactivación más comunes que se usan en la industria, que están implementados en el paquete son:

- Modelo de Bigelow (Bigelow, 1921)
- Modelo de Peleg (Peleg & Cole, 1998)
- Modelo de Mafart (Mafart, Couvert, Gaillard, & Leguerinel, 2002)
- Modelo de Geeraerd (Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005)

### 3 Aplicación del diseño óptimo de experimentos a inactivación microbiana.

#### 3.1 Modelos de inactivación

Los modelos de inactivación tratan de describir la cinética de inactivación de microorganismos. Ésta se suele producir al someter la población microbiana a la acción de un agente letal de forma que se produzca una disminución de la concentración.

Nicolas Appert descubrió en 1810 (Nicolas Appert, 1810) que aplicando tratamientos térmicos a ciertos alimentos se conseguía aumentar la vida del producto, a pesar de que no fue capaz de explicar este fenómeno fue el fundador de la primera fábrica comercial de conservas en el mundo.

Tuvo que pasar medio siglo para que Louis Pasteur formulara en 1860 (Dubos, 1998) que el tratamiento térmico inactivaba los microorganismos, dando lugar con sus descubrimientos al inicio de la llamada “Edad de Oro de la Microbiología”.

Gracias a los experimentos de Bigelow y Esty en 1920 (Bigelow, 1921) que consistieron en realizar un tratamiento térmico a un microorganismo específico (*Clostridium botulinum*), tomando muestras a tiempos distintos para realizar el recuento del número de microorganismos existentes. Según sus resultados, describieron la inactivación microbiana como una cinética de primer orden o logarítmica. En la Figura 4 se representa de forma cualitativa una curva de inactivación. A este modelo, descrito en la Ecuación (13)(3) se le suele denominar como modelo de Bigelow.

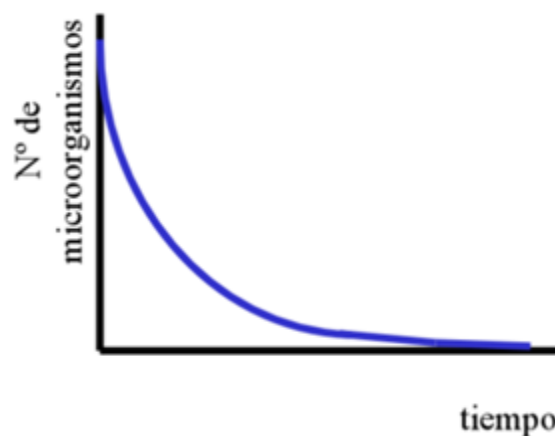


Figura 4. Experimentos de Bigelow y Esty (Palop Gómez, 2014).



$$N = N_0 \cdot e^{-\frac{1}{D}t} \quad (13)$$

Este modelo permite predecir la evolución de una población microbiana en función del número inicial de microorganismos,  $N_0$ , un parámetro que cuantifica su termorresistencia,  $k$ , y el tiempo de calentamiento,  $t$ . Este modelo permite calcular la intensidad de los tratamientos térmicos necesaria para obtener un determinado nivel de inactivación. Además, según este modelo, es imposible alcanzar la esterilidad microbiológica absoluta.

Actualmente, no existen métodos analíticos para la determinación de la termorresistencia del modelo (parámetro  $D$ ). Por lo tanto, este parámetro se debe estimar experimentalmente. Los métodos más habituales son el de tubos o capilares (Palop Gómez, 2014).

Experimentos posteriores a los de Bigelow y Esty han demostrado que en la inactivación microbiana entran en juego varios parámetros que fueron no considerados en el modelo original (Ecuación (14)). Así pues, la comunidad científica ha desarrollado modelos y parámetros alternativos a los tradicionales.

Los modelos predictivos de la inactivación microbiana se pueden dividir en (Corradini, Normand, & Peleg, 2010):

- Modelos deterministas: se trata de modelos matemáticos que no consideran la incertidumbre o la variabilidad dentro de la población microbiana. De manera que producen una estimación discreta de la evolución de la población en cada punto.
- Modelos estocásticos o probabilísticos: tienen en cuenta la variabilidad y la incertidumbre existente dentro de la población microbiana. Por lo tanto, predicen la distribución de probabilidad de la evolución del microorganismo en cada punto.

Los modelos probabilísticos tienen en cuenta que cada individuo tiene una sensibilidad diferente al estrés y por lo tanto muere a un tiempo específico. De esta forma, la curva de supervivencia consiste en una forma acumulada de eventos locales (distribución de Weibull, representada en la Figura 5). En el trabajo se utiliza el modelo de Mafart (Mafart,

Couvert, Gaillard, & Leguerinel, 2002), un modelo probabilístico basado en esta distribución.

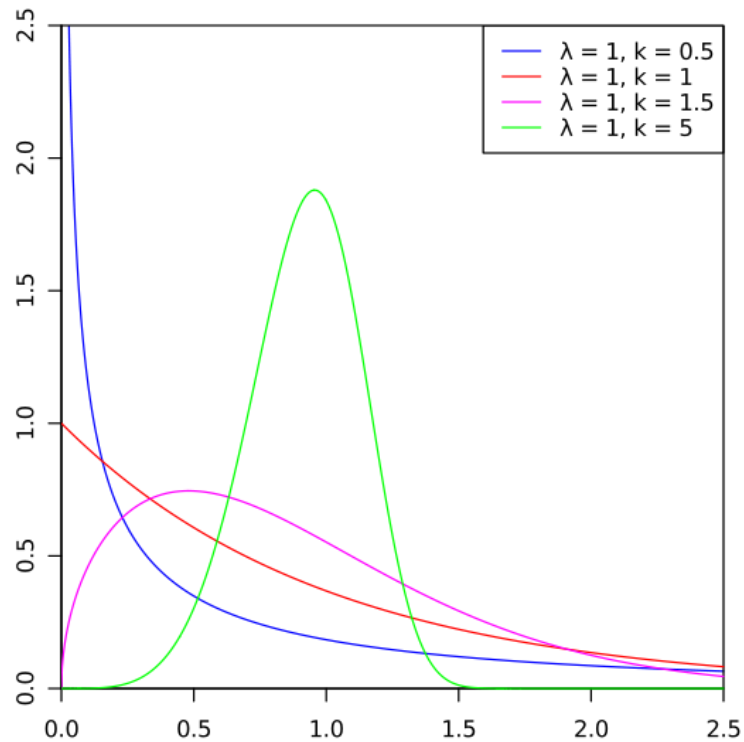


Figura 5. Distribución de Weibull (Palop Gómez, 2014).

La ecuación del modelo de Mafart es:

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (14)$$

$$\log \delta(T) = \log \delta_{ref} + \frac{T_{ref} - T}{z} \quad (15)$$

Donde  $p$  es un factor de forma y  $\delta$  un factor de escala. Desde el punto de vista microbiológico,  $\delta$  describe el tiempo necesario para la primera reducción logarítmica, mientras que  $p$  indica la convexidad de la curva de inactivación a temperatura constante.

### 3.2 Microorganismo analizado

En este trabajo se ha realizado un diseño óptimo de experimentos para la caracterización de *Listeria monocytogenes*, la bacteria causante de la listeriosis. Se trata de uno de los patógenos causantes de infecciones alimentarias más virulentos, con una tasa de

mortalidad de entre el 20 y el 30 %, de las más altas en infecciones alimentarias. Es un bacilo, bacteria con forma cilíndrica alargada de 0.4 a 0.5 micrones de ancho por 0.5 a 1.2 de largo, en la Figura 6 se observa la morfología de la *L. monocytogenes*. Este bacilo es capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1°C a 45°C) y unas condiciones de baja actividad del agua. Presenta movilidad a 30°C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos, estructura que sirve para impulsar a la bacteria, se inactivan.

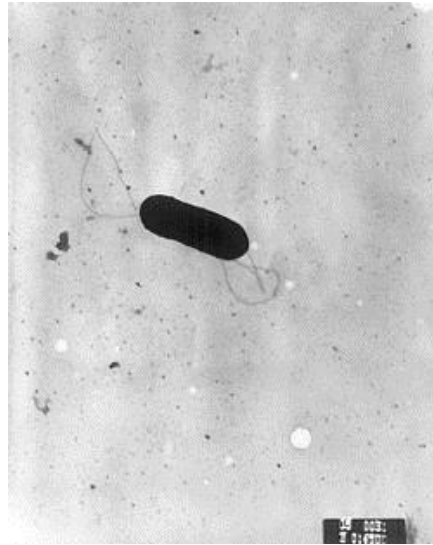


Figura 6. *L. monocytogenes*

La *L. monocytogenes* debe su nombre al médico y cirujano Joseph Lister (1827-1912), el cual realizó notables aportaciones a la medicina. La infección en humanos (listeriosis humana) fue descrita por primera vez en 1929 por Murray (Murray, Webb, & Swann, 1926). Los pacientes padecían una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa. En 1936, Burn aisló el microorganismo en cadáveres neonatos, reconociéndose por primera vez a *L. monocytogenes* como agente causal de infección humana durante el periodo perinatal y como responsable de meningitis en adultos. Entre 1949 y 1957 se dio en Alemania el primer brote conocido asociado a ingesta de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* al consumo de diversos productos elaborados con leche no pasteurizada.

La *L. monocytogenes* se encuentra en el suelo, agua, vegetales en descomposición y tracto digestivo animal. El hombre puede ser un hospedador accidental y el 5 % de individuos sanos son portadores fecales. Tienen una alta capacidad de resistencia a condiciones adversas, como se muestra en la Tabla 1.

Condiciones de crecimiento		Mínimo	Máximo	Óptimo
Temperatura	(°C)	-2 a 4	~45	30 a 37
pH	(HCl como acidulante)	4,2 a 4,3	9,4 a 9,5	7,0
a <sub>w</sub> (actividad H <sub>2</sub> O)	(NaCl como humectante)	0,90 a 0,93	>0,99	0,97
Concentración de sal	(NaCl % en fase acuosa)	<0.5	12 a 16	-

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de *L. monocytogenes* (FSAI, 2005)

Como reservorio intestinal se halla en una amplia gama de especies animales entre las que se encuentran los mamíferos, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de casos de listeriosis animal se producen en rumiantes.

Las vías de transmisión pueden ser:

- Vía digestiva: por falta de higiene o inadecuado procesado de los alimentos.
- Vertical: de madre embarazada a feto. Vía transplacentaria o vía perinatal.
- Zoonótico: contacto con animales enfermos, lo cual es poco frecuente, como podría ser el caso de veterinarios y ganaderos después del parto de un animal infectado.

Actualmente se reconoce que la mayoría de los casos de listeriosis humana son de transmisión alimentaria (99%) debido a la falta de higiene (Ruiz Gómez, 2016), contaminación cruzada, inadecuado procesado de los alimentos tanto en la transformación de los alimentos en la industria como en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar, como pueden ser: alimentos crudos o curados de origen animal (patés, embutidos, carne cruda), alimentos sin lavar como vegetales o fruta, productos lácteos sin pasteurizar (leche o queso) y alimentos preparados.

Los principales grupos de riesgo son las embarazadas, los recién nacidos, los ancianos y los inmunocomprometidos. La letalidad se da principalmente en estos grupos de riesgo, donde se puede alcanzar el 30 % de tasa de mortalidad.

El riesgo de contraer la listeriosis depende de:

- Virulencia (o capacidad de producir enfermedad) de la *L. monocytogenes*.
- La concentración del patógeno en el alimento.

La comisión Europea del Codex Alimentario (CAC) elaboró un documento para regular los criterios microbiológicos de *L. monocytogenes* en alimentos preparados. La Regulación (EC) nº 2073/2005 estableció como criterios:

- Una concentración máxima de 100 UFC/g, siempre y cuando este nivel no se supere durante el proceso de conservación del alimento, o,
- La ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g del alimento, en el caso de que no se pueda garantizar la ausencia de crecimiento microbiano durante el proceso de conservación.

La incidencia es baja (0.3 por 100000 habitantes/año) tanto en Europa como en Estados Unidos. El número de casos registrados en España entre 2008 y 2013 se muestran en la Figura 7.

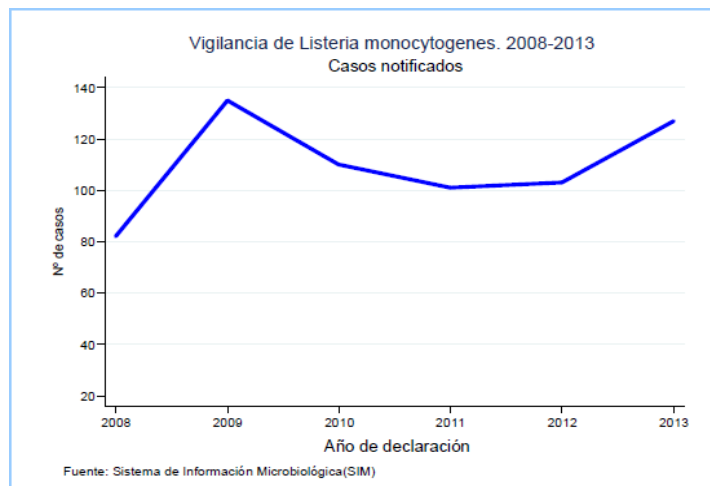


Figura 7. Vigilancia de *L. monocytogenes* entre 2008 y 2013. Casos notificados. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica Informe Anual. Año 2013.

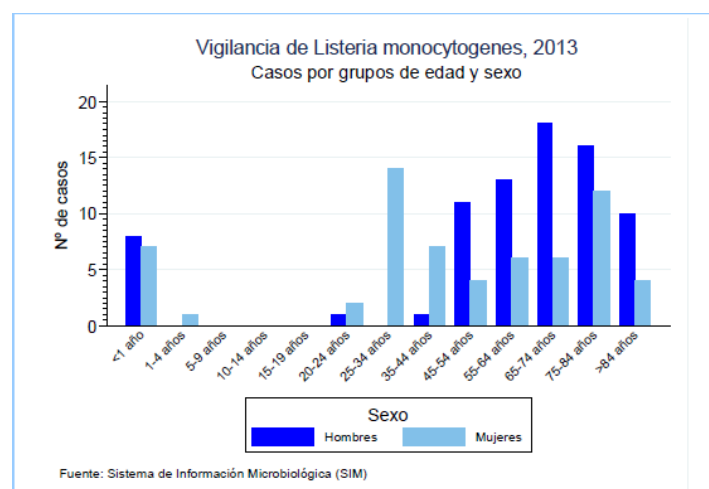


Figura 8. Vigilancia de *L. monocytogenes*, 2013. Casos por grupos de edad y sexo. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica Informe Anual. Año 2013.

En cuanto a la distribución por edad y sexo (Figura 8), se observa que los grupos con mayor proporción de casos son aquéllos que corresponden con los más vulnerables a la infección: recién nacidos, mujeres en edad fértil, es decir embarazadas, y ancianos.

La infección se adquiere tras la ingesta de alimentos contaminados como la leche o quesos mal curados, carnes o embutidos entre otros. Tras el paso de la barrera intestinal pasa al torrente sanguíneo y son transportadas al hígado y al bazo. A menos que su replicación sea controlada por una respuesta inmune innata eficaz, las bacterias continuarán dividiéndose y vuelven a entrar en el torrente sanguíneo. En embarazadas puede atravesar la barrera placentaria y causar la infección fetal. La infección suele iniciarse con una gastroenteritis febril con bacteriemia, presencia de bacterias en sangre, y posterior siembra en otros órganos. Los últimos brotes de listeriosis registrados en España se dieron en Septiembre del 2012 y noviembre de 2015 debido al consumo de un alimento contaminado<sup>2</sup>.

El 25 de Junio del año 2016, la empresa General Mills Inc. retiró del mercado 4 productos de su marca debido a una contaminación por *L. monocytogenes*. Se trata de barras de cuatro sabores distintos compuestas por semillas de girasol contaminadas<sup>3</sup>.

### 3.3 Condiciones experimentales

Para el cálculo de las funciones de sensibilidad, requeridas para el diseño óptimo de experimentos, es necesario conocer unos valores nominales de los parámetros del microorganismo. Éstos han sido obtenidos por medio de experimentos de inactivación isotermos realizados a varias temperaturas dentro del rango estudiado. Los experimentos han sido realizados por el personal del Departamento de Ingeniería de los Alimentos y el Equipamiento Agrícola de la Universidad Politécnica de Cartagena. En el Apéndice A se muestra el código utilizado para el ajuste de los datos isotermos. Los parámetros del microorganismo para las condiciones del experimento son:  $\delta = 3.9$ ,  $z = 4.2$ ,  $p = 1$  y  $N_0 = 10^6$ .

El diseño de experimentos se realizará para dos perfiles de temperatura distintos, en las Figura 9 y Figura 10 se observa la evolución de la curva de inactivación para cada uno de

---

<sup>2</sup>[http://www.archive-es-2013.com/es/b/2013-01-18\\_1186775\\_12/Recientes-brotes-de-Listeria-monocytogenes-originados-por-consumo-de-quesos-frescos/](http://www.archive-es-2013.com/es/b/2013-01-18_1186775_12/Recientes-brotes-de-Listeria-monocytogenes-originados-por-consumo-de-quesos-frescos/)

<sup>3</sup><http://www.foodsafetynews.com/2016/06/listeria-concerns-prompt-recall-of-nature-valley-granola-bars/#.V4uvyzUhG2t>

los dos perfiles. En la Figura 9 se muestra el primer perfil de temperatura en rampa que consiste en un aumento lineal de la temperatura, pasando de 30°C a 60° en 60 segundos.

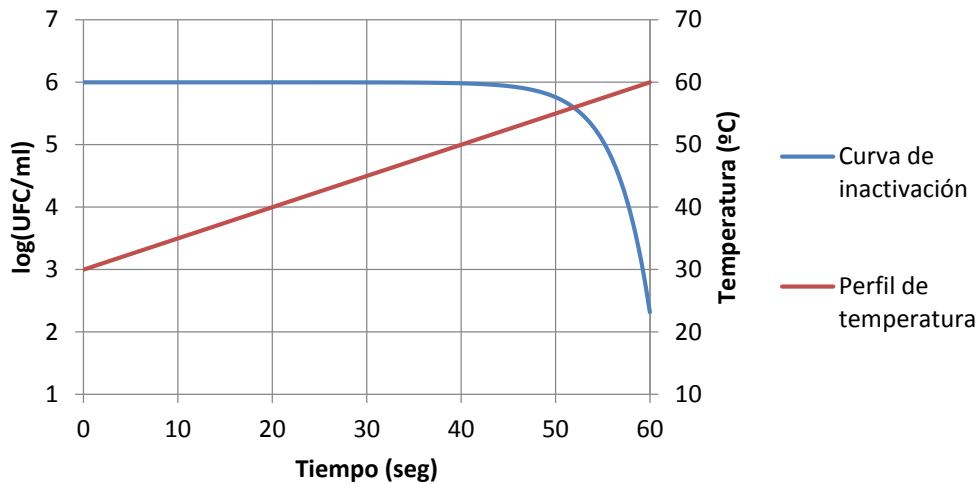


Figura 9. Curva de inactivación para el perfil de temperatura en rampa.

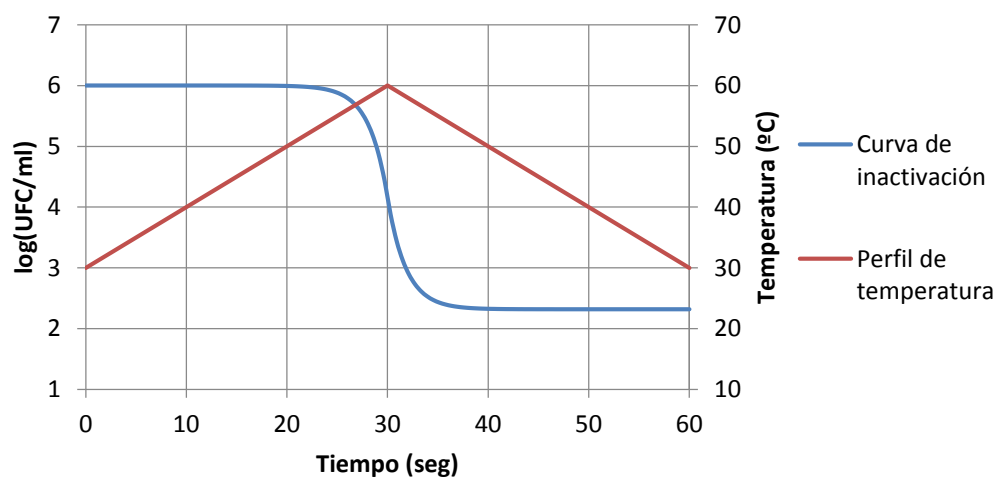


Figura 10. Curva de inactivación para el perfil de temperatura triangular.

En la Figura 10 se representa el segundo perfil que se investiga en el experimento, se trata de un perfil triangular que pasa de 30°C a 60°C en 30 segundos y luego baja hasta los 30°C en los siguientes 30 segundos. La curva de inactivación tiene un comportamiento distinto, concentrándose la mayor parte de la inactivación en torno al máximo del perfil de temperaturas.

### 3.4 Metodología para el diseño óptimo de inactivación microbiana

El diseño de experimentos tiene como objetivo conseguir la distribución de los tiempos para tomar medidas en la muestra de forma que permitan estimar los parámetros del modelo con la máxima precisión posible.

Este problema se resolvió considerando las siguientes condiciones:

- La variable de decisión son los puntos en los que se tomaran las mediciones, que se fijó en 10.
- Se estudiaron por separado los dos perfiles de temperatura presentados.
- En cada caso, se ha realizado la optimización dos veces: tomando los criterios D o E modificado como función objetivo. Por lo que se obtendrán dos resultados diferentes.
- El problema se resolvió con el método de optimización local L-BFGS-B (Byrd, Nocedal, & Zhu, 1995) del paquete **optim** (Belisle, 1992) de R. Debido a la no convexidad de la función objetivo, se ha utilizado un procedimiento multiarranque. Es decir, se ha repetido el diseño óptimo tomando diferentes puntos iniciales. Estos puntos iniciales son forzados para que estén repartidos en intervalos de tiempo repartidos a lo largo de todo el experimento.



## 4 Resultados.

En este apartado se presentan los distintos resultados obtenidos tras el diseño óptimo de experimentos realizado. En el apéndice B está recogido el código para llevar a cabo esta tarea.

En primer lugar realizó un análisis de la sensibilidad de las salidas del modelo con respecto a sus parámetros para obtener los intervalos de tiempo en los que el modelo tiene mayor sensibilidad. A continuación, tras analizar estos resultados, se realizaron los diseños óptimos de experimentos para cada perfil de temperatura. Cada diseño ha sido calculado para los criterios D y E modificado, por lo que se comparan los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

Cabe destacar que, al abordar este problema por primera vez, las soluciones obtenidas proporcionaron un tiempo entre observaciones excesivamente corto que hace imposible aplicar el experimento en el laboratorio. Por lo tanto, posteriormente se repitió el procedimiento incorporando un término de penalización a la función de coste con el objetivo de obtener soluciones físicamente posibles. Más adelante en el trabajo se discute la elección de la función penalizadora, comparando posibles alternativas.

En la parte final de esta sección se presentan las conclusiones extraídas tras el diseño óptimo de experimentos.

### 4.1 Funciones de sensibilidad.

Los resultados del análisis de sensibilidad de la *L. monocytogenes* para el perfil de temperatura de rampa se muestran en la Figura 11, donde se representan tanto las funciones de sensibilidad de los parámetros del modelo como la curva de inactivación para el primer perfil. La primera observación que se destaca es que el parámetro  $p$  es el que mayor influencia tiene en el modelo por otro lado, se observa que el modelo es más sensible cuando la curva de inactivación cae. La influencia de los parámetros con respecto al modelo crece exponencialmente con el tiempo. El parámetro  $N_0$  tiene una influencia prácticamente nula mientras que los parámetros  $\delta$  y  $z$  tienen una influencia notable sobre la salida del modelo.

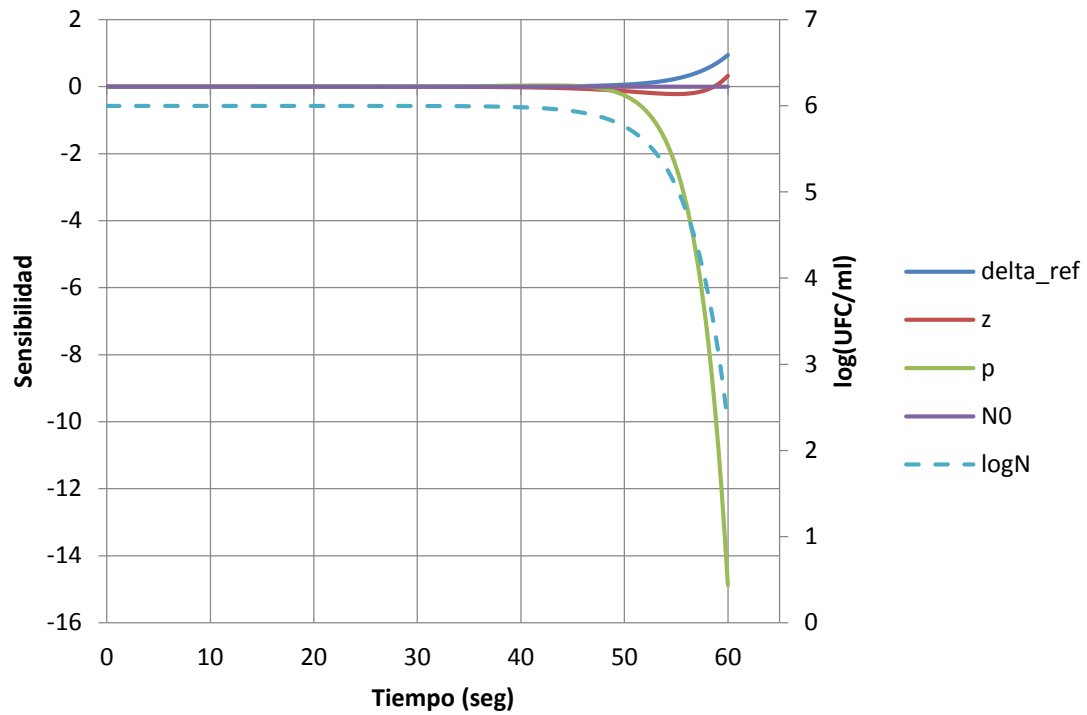


Figura 11. Funciones de sensibilidad locales para el perfil de temperatura en rampa. En línea discontinua se muestra la curva de inactivación para este perfil.

Los resultados de la sensibilidad para el perfil de temperatura triangular se observa en la Figura 12.

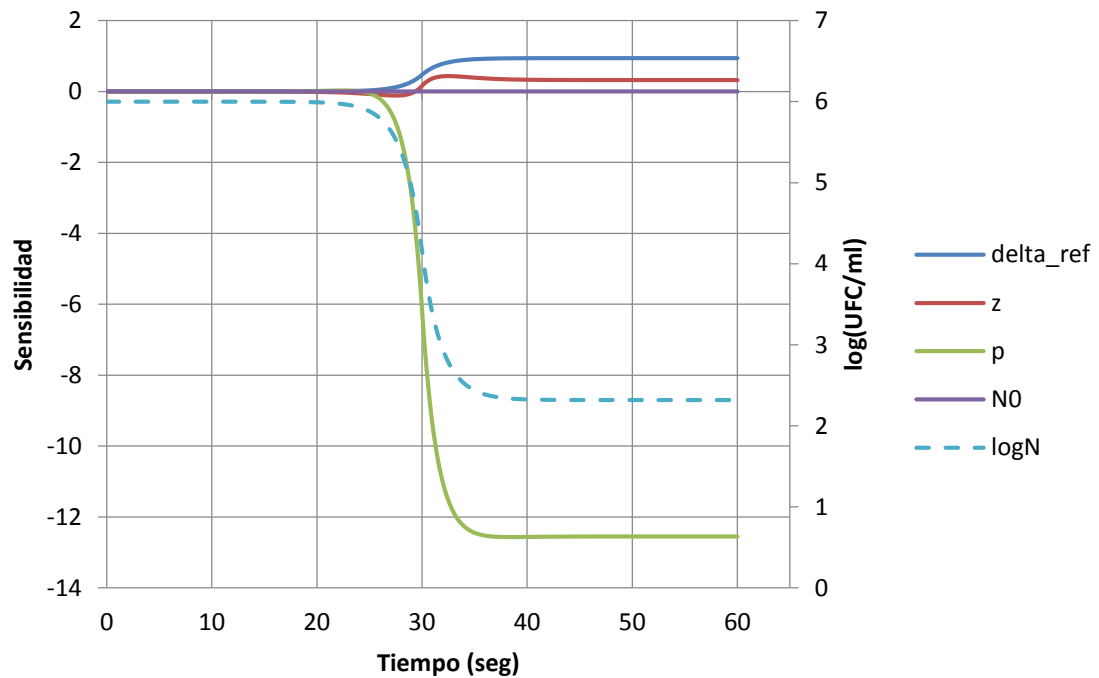


Figura 12. Función de Sensibilidad para el perfil de temperatura triangular.

Para el segundo perfil de temperatura, volvemos a observar que los parámetros del modelo influyen a partir de la modificación de la curva de inactivación, siendo  $p$  el parámetro más influyente. Por otro lado también se observa la sensibilidad prácticamente nula al parámetro  $N_0$ .

Estas gráficas hacen intuir que el DOE favorecerá la toma de medidas en la zona de tiempos donde la curva de inactivación cambia de pendiente.

En la Figura 13 se muestra gráficamente la identificabilidad local *a priori* para el perfil de temperatura en rampa, en forma de correlaciones entre parámetros. En dicha figura se observa una alta correlación entre los parámetros. Para  $p-N_0$  y  $\delta_{ref}-p$  hay una correlación de -1. La correlación entre  $\delta_{ref}-N_0$  es 1. Esto indica que el modelo elegido presenta problemas de identificabilidad.

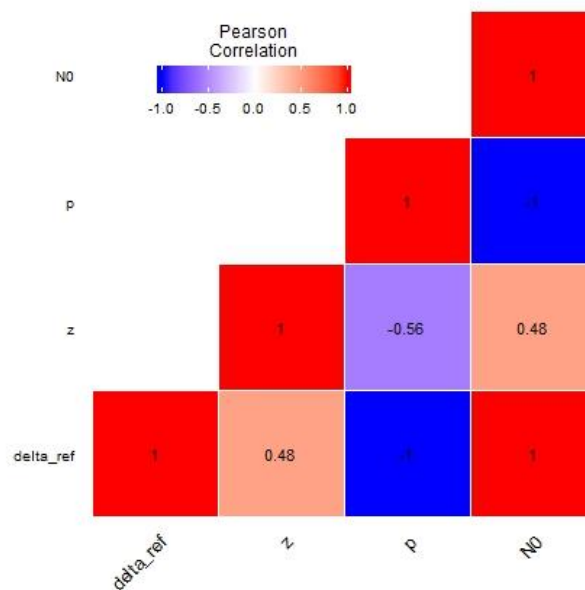


Figura 13. Resultados del análisis de identificabilidad *a priori* para el perfil de temperatura en rampa.

En la Figura 14 se representa gráficamente la identificabilidad local *a priori* para el perfil de temperatura triangular, de nuevo en forma de correlaciones entre los parámetros.

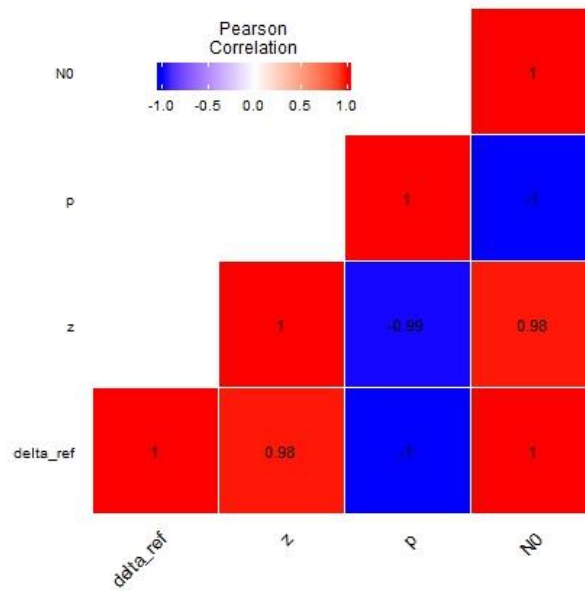


Figura 14. Resultados del análisis de identificabilidad a priori para el perfil de temperatura triangular.

En este caso se observa una alta correlación entre las funciones de sensibilidad asociadas a todos los parámetros, esto podría indicar una deficiencia estructural en el modelo que dificultaría la determinación de los parámetros. Estas altas correlaciones observadas también podrían deberse a falta de información en la toma de datos, aunque esto sólo podría comprobarse si tras realizar el diseño óptimo y tomar nuevos datos experimentales las correlaciones se modificaran.

Los gráficos anteriores muestran que la correlación entre los parámetros no es constante, sino que depende de las condiciones de operación.

#### 4.2 Diseño óptimo sin penalti (criterio D y E modificado).

Los resultados del diseño de experimentos para cada simulación se ilustran en las Figura 15 y Figura 17. En ella se muestra la distribución de probabilidad de las mediciones generadas en cada uno de los diseños, lo que proporciona una primera impresión de qué zonas del eje de tiempos están más pobladas. Estas mediciones provienen de los resultados de optimización del método multiarranque. En ellas queda claro que el problema de optimización formulado es multimodal. El diseño de experimentos consiste en optimizar la función de cada criterio con el objetivo de encontrar el conjunto de tiempos óptimos. En la Ecuación (16) se formula de nuevo el problema de optimización para el criterio D.

$$\max \det(\text{FIM}) \quad (16)$$

Para el criterio E, la formulación del problema se expresa en la Ecuación (17).

$$\min \text{abs} \left( \frac{\lambda_{\max}(\text{FIM})}{\lambda_{\min}(\text{FIM})} \right) \quad (17)$$

En la Figura 15 podemos observar la densidad de probabilidad de las mediciones para el perfil en rampa y la curva de inactivación del microorganismo.

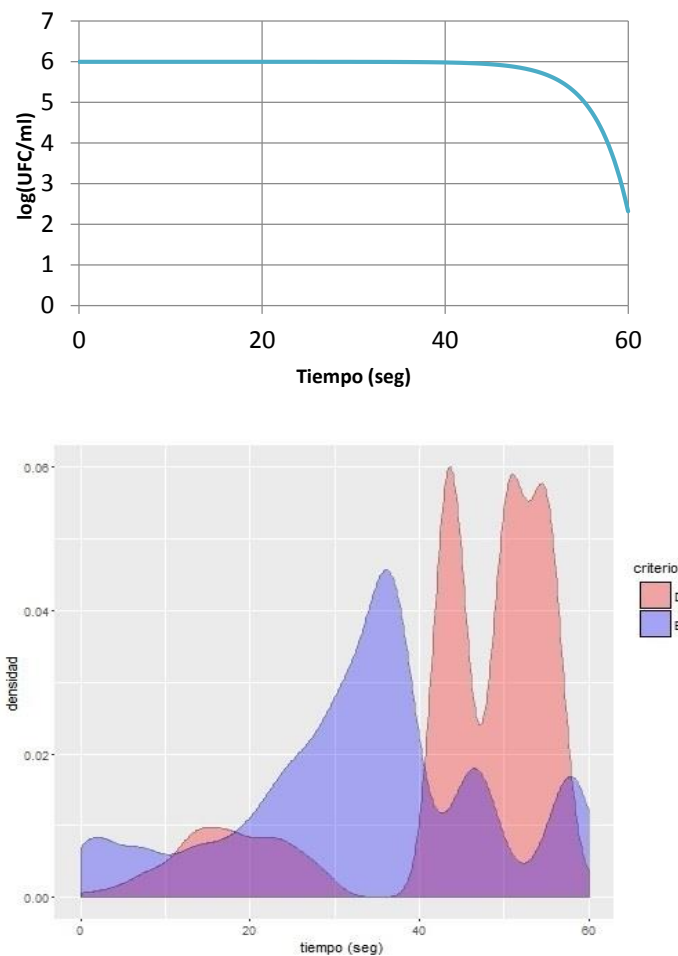


Figura 15. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarranque para el perfil en rampa.

Ambos diseños tienen poca densidad de puntos para tiempos iniciales y una alta densidad para tiempos que coinciden con la última parte del experimento. Esto tiene sentido teniendo en cuenta los valores que se obtuvieron para las funciones de sensibilidad locales (sección 4.1). El criterio E modificado, tiene la mayor concentración de tiempos para el intervalo de tiempo entre 20 y 40; mientras que el criterio D tiene una mayor concentración entre los segundos 40 y 60. Los diseños

obtenidos en cada una de las simulaciones individuales del procedimiento multiarranque se muestran en la Figura 16.

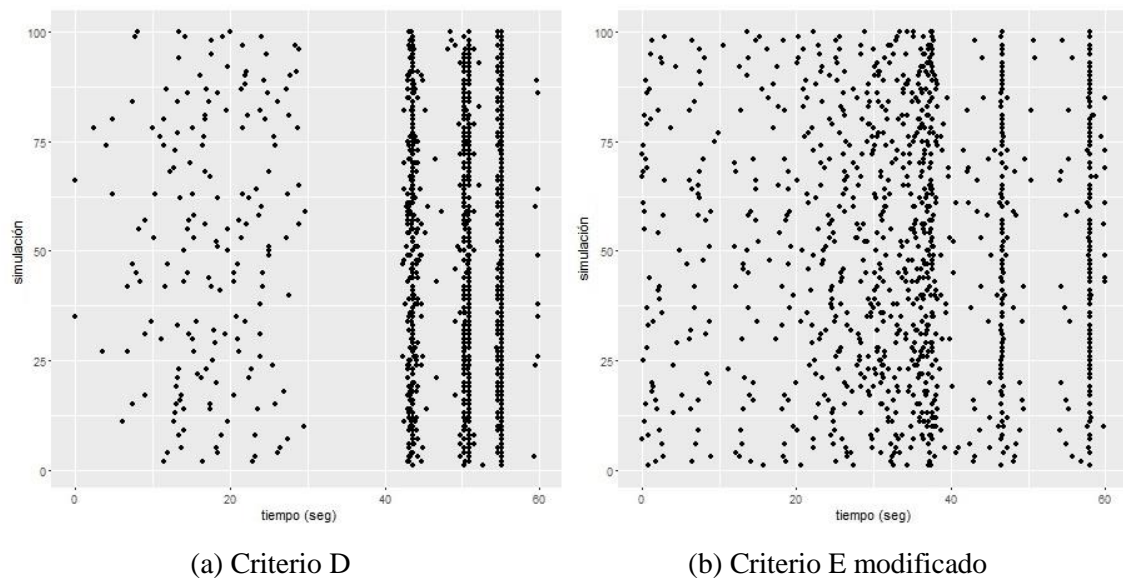


Figura 16. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura en rampa.

En la Figura 16 (a) se representan las soluciones para el criterio D, mientras que en la Figura 16(b) para el criterio E-modificado. Ambos criterios coinciden en colocar los puntos en 3 zonas concretas de la última parte del experimento. Para el criterio D se sitúan en torno a los segundos 42, 50 y 52. Los segundos 37, 43 y 58 son los intervalos elegidos por el criterio E modificado.

En la Figura 17 se observa la densidad de probabilidad de la localización de los puntos calculados para el perfil de temperatura triangular y la curva de inactivación.

Cuando la temperatura tiene un perfil triangular, tanto el criterio D como E modificado, distribuyen una mayor densidad de puntos en la parte intermedia del experimento. Para ambos métodos, existen dos intervalos de tiempos donde la densidad de puntos es alta. El intervalo de tiempo que va del segundo 40 al 60 es compartido por ambos métodos. El criterio D tiene la mayor densidad en el intervalo de 20 a 40 segundos, mientras que en el criterio E modificado ocurre entre el 10 y 30 segundos. En cualquier caso, el diseño de experimentos obtenido en ambos casos es bastante similar. La distribución de puntos para el perfil de temperatura triangular se muestra en la Figura 18.

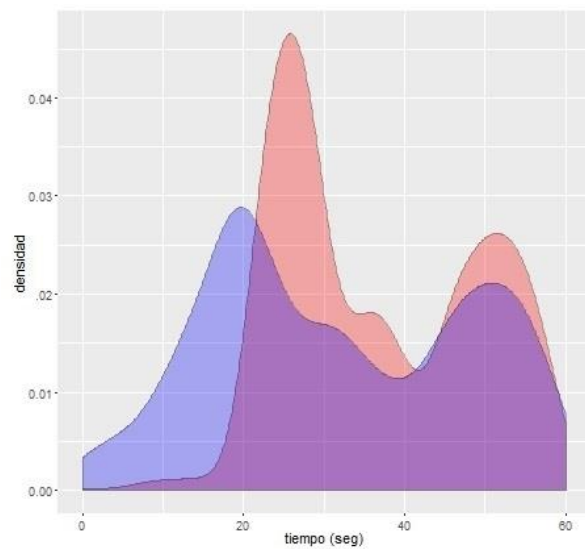
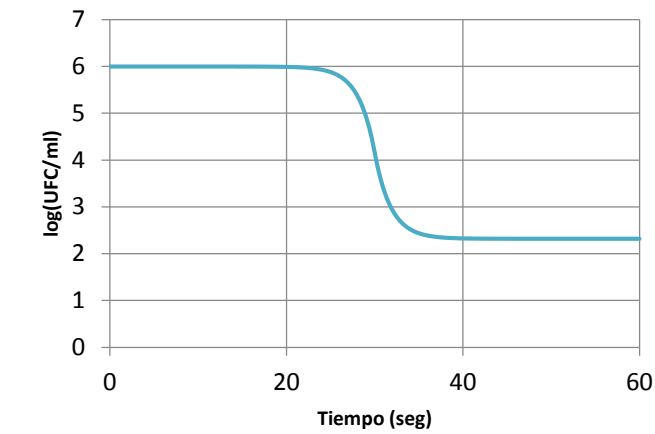
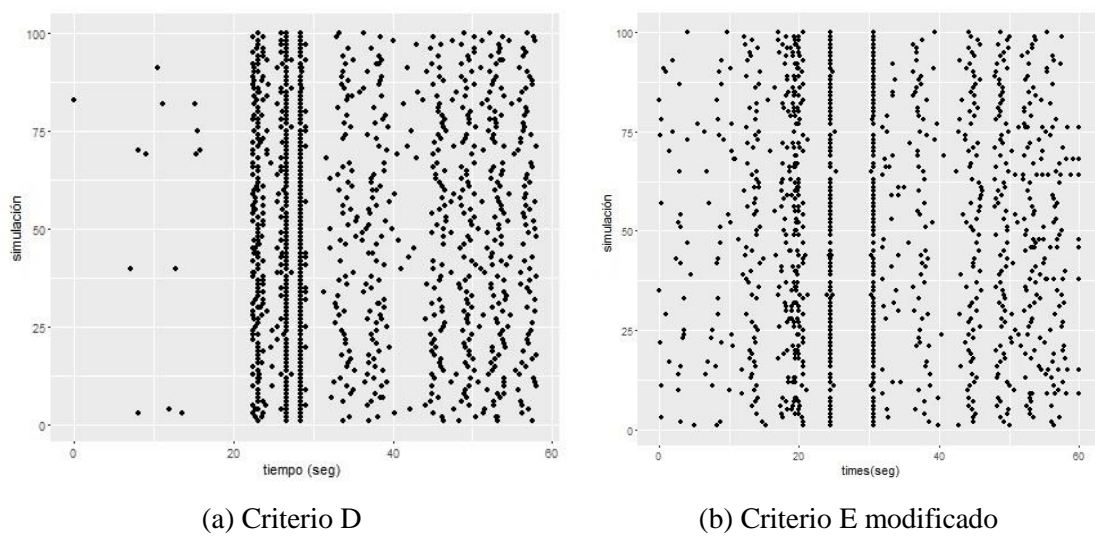


Figura 17. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarranque para el perfil triangular.



(a) Criterio D

(b) Criterio E modificado

Figura 18. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura triangular.

En la Figura 18 (a) se muestran los resultados para el criterio D, mientras que en la Figura 18 (b) para el criterio E modificado. Para el perfil de temperatura triangular se obtienen resultados análogos a los obtenidos para el perfil en rampa, las mediciones se concentran en tres franjas. Sin embargo, en este caso, se concentran en la parte intermedia del experimento. Este resultado está en consonancia con las funciones de sensibilidad calculadas anteriormente.

La convergencia de las soluciones se puede observar en las Figura 19 y Figura 20, donde se muestran las curvas de densidad de los valores de función objetivo de las soluciones obtenidas en el procedimiento multiarraqe para ambos criterios.

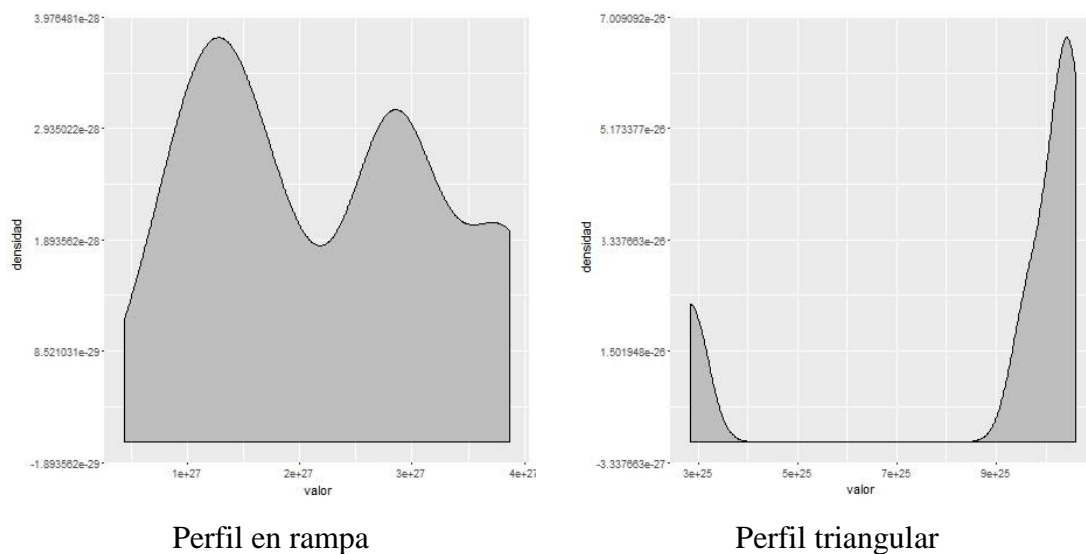


Figura 19. Densidad de probabilidad de las soluciones para el criterio D.

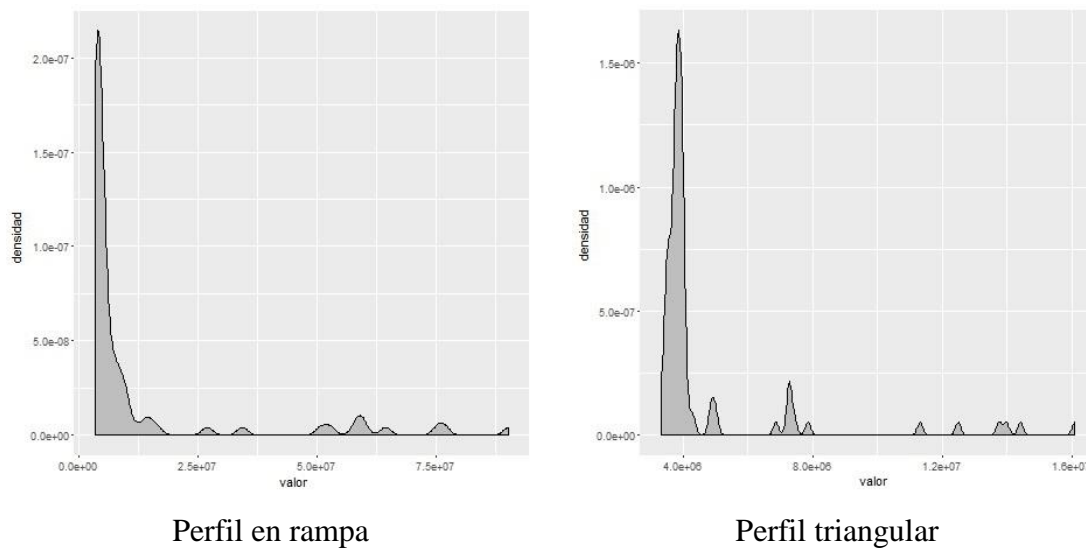


Figura 20. Densidad de probabilidad de las soluciones para el criterio E-modificado.



Como se ha comentado, en las curvas de densidad mostradas se puede observar la multimodalidad de las soluciones. Se observan diferencias entre los dos criterios: para el criterio D se obtienen menos soluciones que en el caso del criterio E modificado que se obtienen muchas más pero se converge mejor al mínimo global.

Las conclusiones que se obtienen de estos cálculos son:

- Ambos métodos dan resultados similares.
- La mayor diferencia está en cómo ocupan los extremos.
- El criterio D tiende a concentrar más las soluciones.

### 4.3 Diseño óptimo con penalización.

Tras el análisis de los resultados del diseño óptimo observamos que muchas de las soluciones óptimas proporcionan puntos que coinciden o que están muy próximos en el tiempo. Esto se debe a que no hay ninguna restricción en el algoritmo que sea capaz de penalizar esas situaciones de tal forma que se obtengan resultados separados en el tiempo lo suficiente como para que el experimento pueda ser llevado a cabo por un ser humano.

Considerando las limitaciones del equipo y del operario, el tiempo mínimo entre medidas debe de ser de 3 segundos. Según los resultados mostrados en el apartado 4.2, el porcentaje de los experimentos que no cumplen esta restricción se muestran en la Tabla 2.

Criterio	Perfil en rampa	Perfil triangular
D	100%	89%
E modificado	100%	77%

Tabla 2. Porcentaje de experimentos que no cumplen la restricción.

Por tanto es necesario realizar un diseño óptimo de experimentos penalizando las situaciones no reales. Se entiende como solución no real aquella en la cual un técnico de laboratorio no es capaz de llevar a cabo el experimento con total normalidad. Por lo tanto, como la variable con la que se optimiza el modelo es el tiempo, se introduce una penalización para aquellos casos en que la solución arroja puntos con una distancia entre ellos menor que 3 segundos, tiempo mínimo en el que un técnico de laboratorio es capaz

de tomar una muestra. La penalización consiste en modificar la función de coste de tal forma que cuando se viole la restricción el valor de la función objetivo se aleje del de las soluciones óptimas. La ecuación (18) define la función de coste penalizada para el criterio D y la ecuación (19) para el criterio E modificado:

$$C = \det(FIM) - 10^{15} \cdot \text{penalty} \quad (18)$$

$$C = \text{abs} \left( \frac{\lambda_{\max}(FIM)}{\lambda_{\min}(FIM)} \right) + \text{penalty} \quad (19)$$

La diferencia entre las dos funciones de coste radica en la propia definición de cada criterio, en el caso del criterio D se trata de maximizar el determinante de la matriz de Fisher por lo que la penalización debe restar al determinante para que el algoritmo no lo considere como un máximo. Para el criterio E, se trata de minimizar el valor absoluto de la relación entre los valores propios, máximos y mínimos, de la matriz de Fisher por lo tanto la penalización aumenta el valor para que el algoritmo no considere como óptimos los puntos que violan la restricción. Dado el valor de las funciones objetivos en las soluciones óptimas el valor de la penalización utilizado con el criterio D se multiplica por  $10^{15}$  para que ésta sea efectiva.

Se ha implementado una función de penalización tipo barrera (Kramer, 2010). Teóricamente, ésta debe arrojar un valor infinito si se viola la restricción y un valor nulo en caso contrario. Debido a problemas de estabilidad del algoritmo de optimización se han implementado tres funciones de penalización diferentes.

$$\text{penalty1}(x) = \begin{cases} 1e15 & x \leq 3 \\ 0 & x > 3 \end{cases} \quad (20)$$

$$\text{penalty2}(x) = \begin{cases} 1e15 & x \leq 3 \\ e^{\frac{1}{x-2.97}} - 1 & x > 3 \end{cases} \quad (21)$$

$$\text{penalty3}(x) = \begin{cases} \frac{1e15 - 2e15}{3}x + 2e15 & x \leq 3 \\ e^{\frac{1}{x-2.97}} - 1 & x > 3 \end{cases} \quad (22)$$

donde  $x$  es la distancia mínima entre dos observaciones. En la primera función implementada (*penalty1*), comúnmente llamada "pena de muerte", cualquier solución que viole la restricción establecida proporciona un valor de penalización tendente a infinito.

El algoritmo de optimización empleado puede presentar problemas de convergencia debido a la discontinuidad introducida por esta función. Por ello se probaron también las otras dos funciones de penalización. La función *penalty2* incorpora una rampa exponencial para facilitar la convergencia.

Se ha observado que el algoritmo de optimización empleado no escapa de la zona infactible si el punto inicial empleado para la optimización viola la restricción. Por esto se ha implementado la función *penalty3*, que introduce una rampa dentro de la zona de penalización que “guía” al algoritmo de optimización fuera de ésta.

Para comparar estas funciones y observar cuál de ella obtiene mejores resultados se realiza un diseño óptimo bajo las siguientes condiciones:

- Se usan 100 puntos iniciales en el método multiarranque para cada diseño y perfil de temperatura.
- Se utiliza un método de optimización local.
- Se optimiza según el criterio D.
- Se usa el perfil de temperatura en rampa.

Bajo estas condiciones vamos a analizar la convergencia de cada función así como el valor del determinante de la FIM, valor a optimizar con el criterio D. Los resultados obtenidos para cada una de las funciones se muestran en la Tabla 3.

Funciones	Convergencia	detFIM
Penalty1	13%	2,48e26
Penalty2	38%	4,78e26
Penalty3	46%	4,82e26

Tabla 3. Resultados para funciones de penalización.

En función de los resultados obtenidos se observa que la función *penalty3* obtiene tanto mayor convergencia como mayor valor del determinante, es decir, mejor solución óptima final. En base a esta prueba, se decidió usar la función *penalty3* para el resto de experimentos.

En los siguientes apartados se repiten los cálculos anteriores introduciendo la función de penalización. Se ha seguido la metodología expuesta en el apartado 3.4.

#### 4.3.1 Análisis del diseño de experimentos para el perfil de temperatura en rampa.

En la Figura 21 podemos observar la densidad de probabilidad de las mediciones para el perfil en rampa y la curva de inactivación del microorganismo.

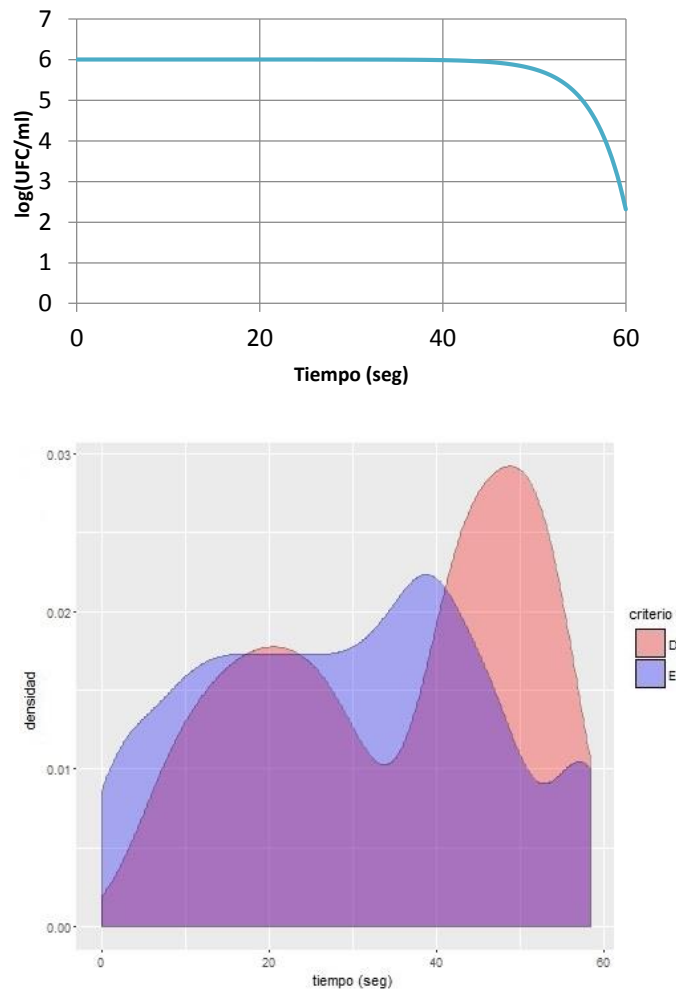


Figura 21. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarranque para el perfil en rampa con penalización.

En la Figura 22 (a) se muestran los resultados para el criterio D donde, de las 100 optimizaciones han convergido un 46. Los puntos aparecen de forma más ordenada a partir del segundo 40, mientras que en el intervalo de tiempo anterior los puntos aparecen de forma más desordenada. Estos resultados son similares a los mostrados en la Figura 16 con los resultados para el criterio D sin función de penalización donde, a partir del segundo 40, aparecen ordenados. Usando la función de penalización conseguimos que a partir del segundo 40 los puntos se distancien entre ellos como mínimo 3 segundos.

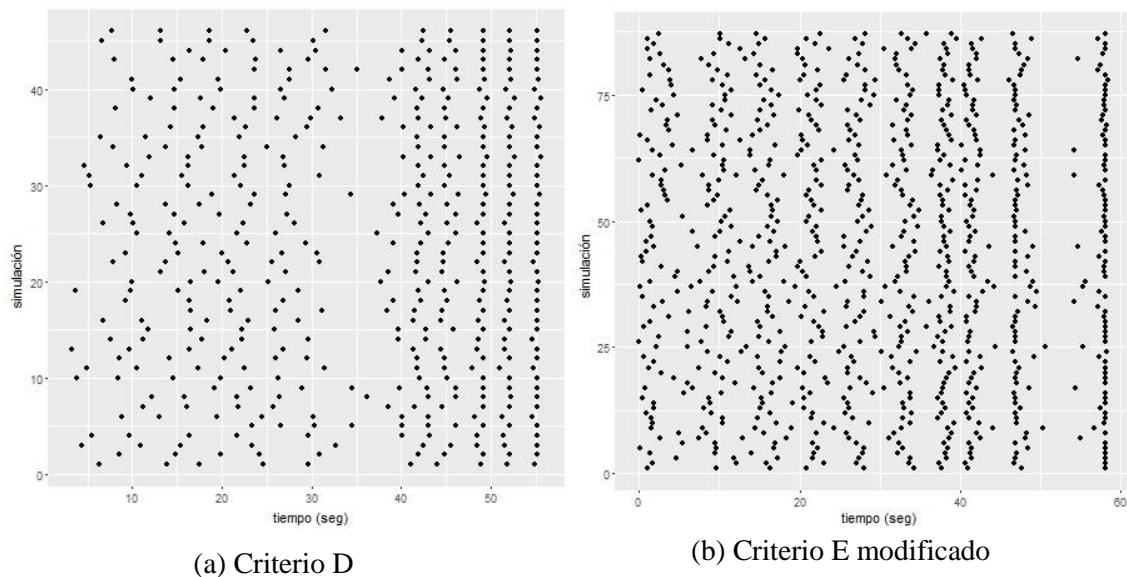


Figura 22. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura en rampa con penalización (eliminadas simulaciones sin convergencia).

Los resultados para la optimización del criterio E modificado se muestran en la Figura 22 (b). La convergencia del algoritmo alcanza el 87% arrojando una distribución de puntos que al igual que en el caso anterior, aparecen más ordenados a partir del segundo 40. Los resultados obtenidos coinciden con los del criterio E modificado sin penalización de la Figura 16, donde también se obtienen las soluciones en torno a los segundos 40, 50 y 60. En este caso la acumulación de soluciones que aparecen para el diseño sin penalización entre los segundos 20 y 40 desaparece pues la penalización de 3 segundos entre puntos hace que estos se distribuyan más en el tiempo.

Se observa que con el criterio E modificado se obtiene una convergencia mayor, esto es debido a que este criterio tiende a repartir los puntos y por lo tanto tiende menos a violar la restricción.

#### 4.3.2 Análisis del diseño de experimentos para el perfil de temperatura triangular.

En la Figura 23 se observa la densidad de probabilidad de la localización de los puntos calculados para el perfil de temperatura triangular y la curva de inactivación.

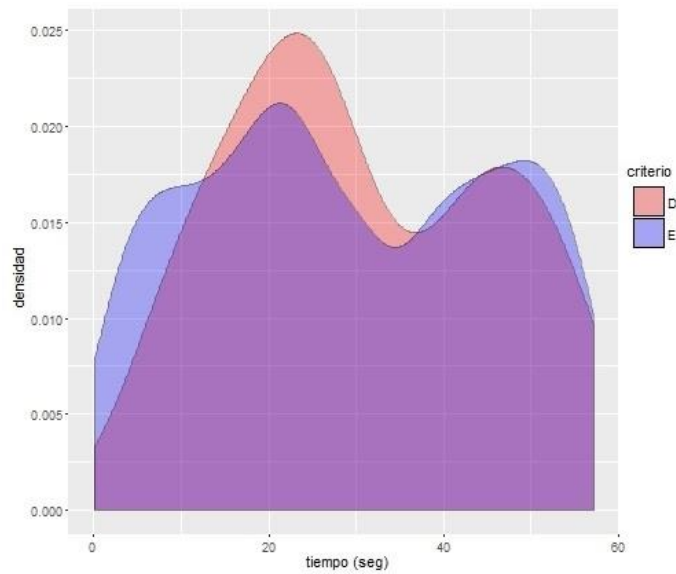
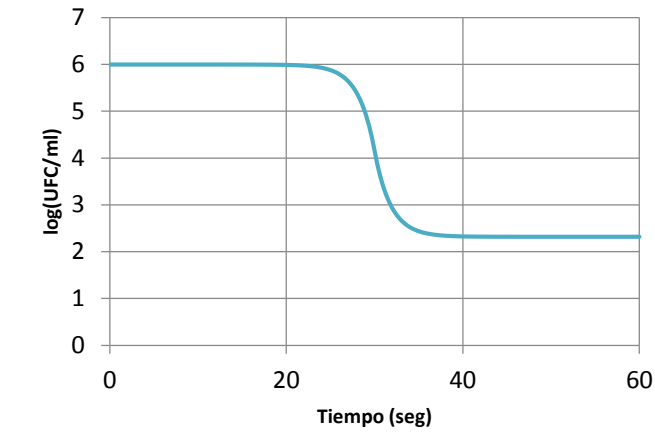
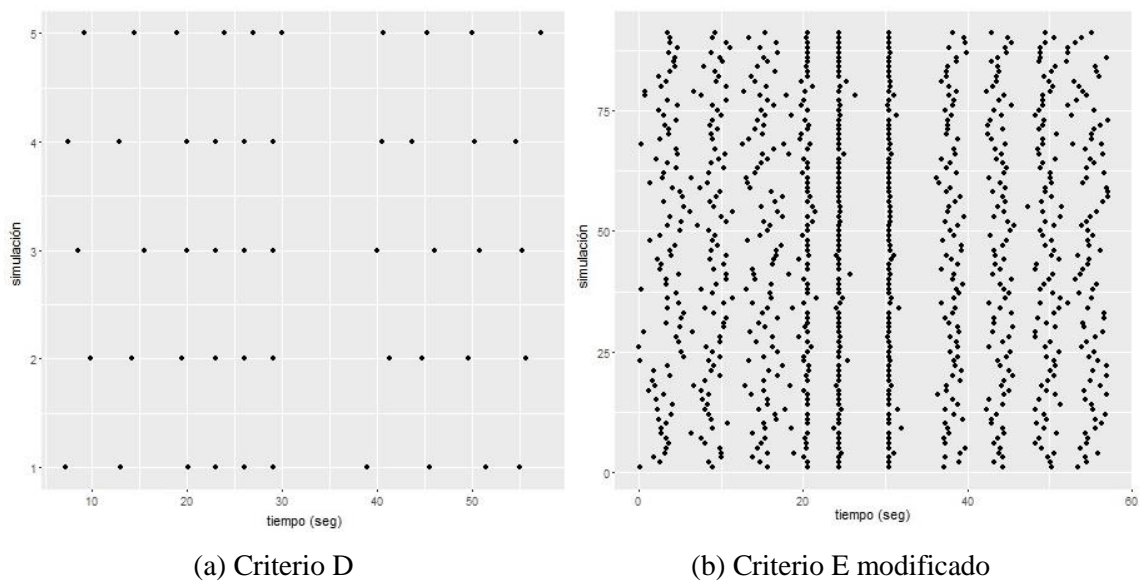


Figura 23. Distribución de los puntos de medición obtenidas por el procedimiento multiarraqe para el perfil triangular con penalización..



(a) Criterio D

(b) Criterio E modificado

Figura 24. Diseño de experimentos para el perfil de temperatura triangular con penalización (eliminadas simulaciones sin convergencia).

En el caso del criterio D los resultados se muestran en la Figura 24 (a), la convergencia es de un 5%. Debido a la baja convergencia en este caso, estos resultados han de estudiarse con cuidado. Sin embargo, se observan resultados similares a los obtenidos en el caso sin penalización (Figura 18), la acumulación de hasta 5 de los 10 puntos entre los segundos 20 y 40.

Para el criterio E modificado los resultados se en la Figura 24 (b), la convergencia es de un 91%. Se observa una clara tendencia de los puntos entre los segundos 20 y 30 a ordenarse en los segundos 20, 24 y 30 al igual que en el caso del diseño para el criterio E modificado sin penalización que se muestra en la Figura 18.

La baja convergencia para el criterio D se debe a que como se observa en la Figura 18, las soluciones tienden a estar muy juntas, sobre todo en la zona entre los segundos 20 y 40, por lo tanto al introducir la función de penalización el método no converge. A diferencia del criterio E modificado que reparte más las soluciones y por lo tanto obtiene una convergencia mayor.

En cualquier caso, un estudio posterior debería contemplar el uso de un algoritmo de optimización global que no haga uso del gradiente.

#### 4.3.3 *Discusión de los resultados.*

En relación a las diferencias encontradas entre los dos criterios se observa una clara tendencia de ambos métodos a distribuir los puntos en las zonas donde mayor sensibilidad tiene el modelo.

En la Figura 15 se observa como ambos criterios concentran los puntos en la parte final del experimento para el perfil en rampa, como se muestra en la Figura 11 el modelo es a partir del segundo 40 cuando tiene mayor sensibilidad y cuando da lugar la inactivación del microorganismo. Por lo tanto, esta concentración de puntos en la zona sensible queda justificada.

Para el perfil triangular ocurre lo mismo: en la Figura 17 se observa una mayor concentración en la parte intermedia del experimento, zona en la cual el modelo es más sensible tal y como se muestra en la Figura 12.

Con el objetivo de cuantificar si el diseño óptimo de experimentos mejorará la estimación de los parámetros y por lo tanto reducirá el intervalo de confianza de las predicciones vamos a comparar los resultados obtenidos para cada criterio con un experimento con datos equiespaciados. Para ello, se dividen los casos en función del criterio utilizado y del perfil de temperatura que se aplica. Para el caso del criterio D, se cuantifica el determinante de la matriz de información de Fisher y para el criterio E modificado se cuantifica el valor absoluto de la relación de los valores propios, mínimo y máximo. Los resultados para el experimento con tiempos equiespaciados se muestran en la Tabla 4.

Criterios	Perfil 1		Perfil 2	
	$det(FIM)$	$abs\left(\frac{\lambda_{\max}(FIM)}{\lambda_{\min}(FIM)}\right)$	$det(FIM)$	$abs\left(\frac{\lambda_{\max}(FIM)}{\lambda_{\min}(FIM)}\right)$
Equiespaciados	1,04E+26	86560837	8,61E+23	29406079

Tabla 4. Valores de función objetivo para los criterios D y E modificado para ambos perfiles de temperatura en un diseño equiespaciado

En la Tabla 5 y en la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los criterios y la variación porcentual de los resultados con respecto al experimento con tiempos equiespaciados.

Criterios	Perfil 1		Perfil 2	
	$det(FIM)$	Variación porcentual	$det(FIM)$	Variación porcentual
Criterio D	4,82E+26	363%	8,77E+25	10086%

Tabla 5. Resultados del diseño óptimo de experimentos y su comparación con un diseño equiespaciado. Criterio D.

En relación al criterio D, con el diseño óptimo de experimentos para el perfil en rampa la variación porcentual del valor del determinante es de un 363.46 %. Para el caso del perfil triangular la variación porcentual es de un 10085.83 %.

Criterios	Perfil 1		Perfil 2	
	$abs\left(\frac{\lambda_{\max}(FIM)}{\lambda_{\min}(FIM)}\right)$	Variación porcentual	$abs\left(\frac{\lambda_{\max}(FIM)}{\lambda_{\min}(FIM)}\right)$	Variación porcentual
Criterio E	12269555	-86%	7276411	-75%

Tabla 6. Resultados del diseño óptimo de experimentos y su comparación con un diseño equiespaciado. Criterio E modificado.



Los resultados del criterio E modificado son una relación de valores propios con una variación porcentual negativa del 85.83% para el perfil en rampa y del 75.26% para el perfil triangular, también negativa.

Estas mejoras porcentuales en los criterios a optimizar deberían ser refrendadas con índices más claramente indicativos sobre la mejora en la información acerca de los parámetros, comparando, por ejemplo, la amplitud de los intervalos de confianza de los mismos entre un diseño óptimo y otro equiespaciado. Para ello sería necesario realizar los experimentos con los resultados del diseño óptimo, algo que trasciende a este trabajo pero que será llevado a cabo próximamente en el laboratorio del Departamento de Ingeniería de los Alimentos y el Equipamiento Agrícola de la Universidad Politécnica de Cartagena.

En la Tabla 7 se muestran los tiempos óptimos para cada criterio considerando la mejor solución obtenida con respecto a las funciones objetivo consideradas tras llevar a cabo el procedimiento multiarranque sobre la formulación penalizada.

		<i>Tiempo (seg)</i>									
<b>Perfil en rampa</b>	Criterio D	23,6	27,5	31,6	35,1	40,0	43,0	46,1	49,1	52,1	55,2
	Criterio E mod	2,5	10,1	14,7	22,6	28,2	32,7	35,8	38,9	46,5	58,0
<b>Perfil triangular</b>	Criterio D	8,4	15,5	20,0	23,1	26,1	29,1	39,9	46,0	50,7	55,3
	Criterio E mod	0,3	12,6	17,7	20,8	24,4	30,6	44,6	49,3	52,9	56,4

Tabla 7. Solución de tiempos para el experimento.

De las Figura 25 aFigura 28 se muestra la distribución de los tiempos donde se realizan las tomas de muestras junto con la curva de inactivación.

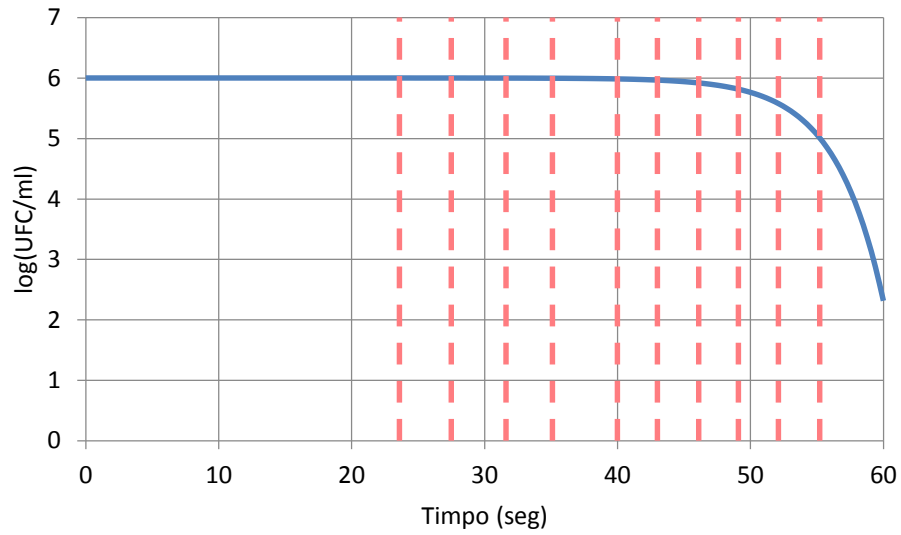


Figura 25. Solución criterio D para perfil en rampa.

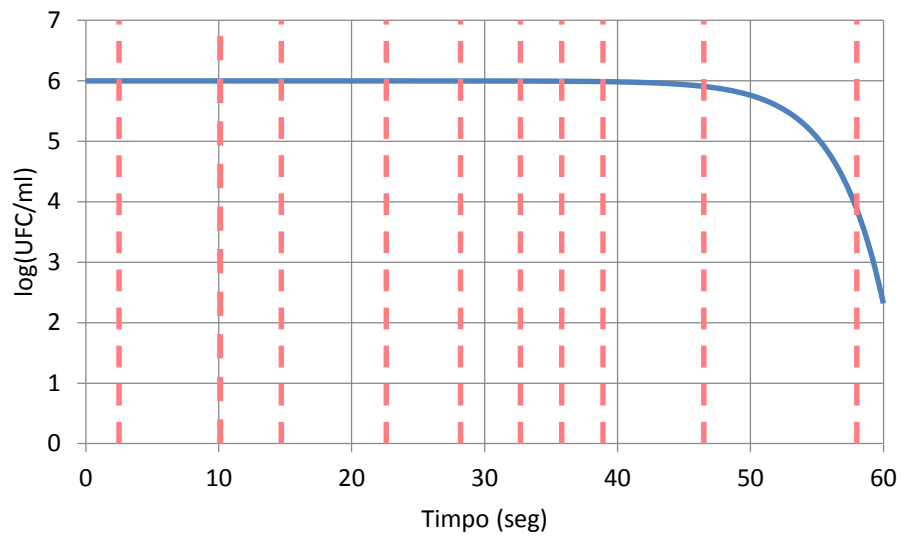


Figura 26. Solución criterio E modificado para perfil en rampa.

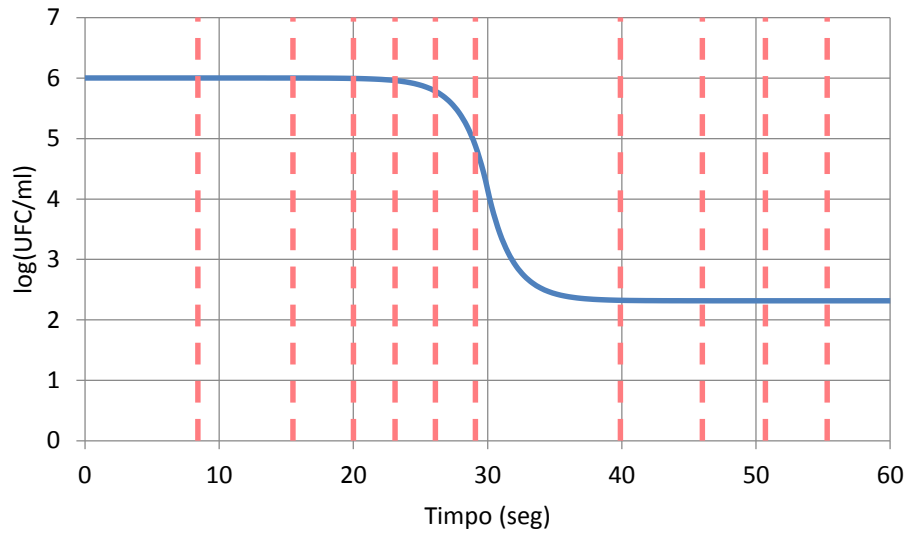


Figura 27. Solución criterio D para perfil triangular.

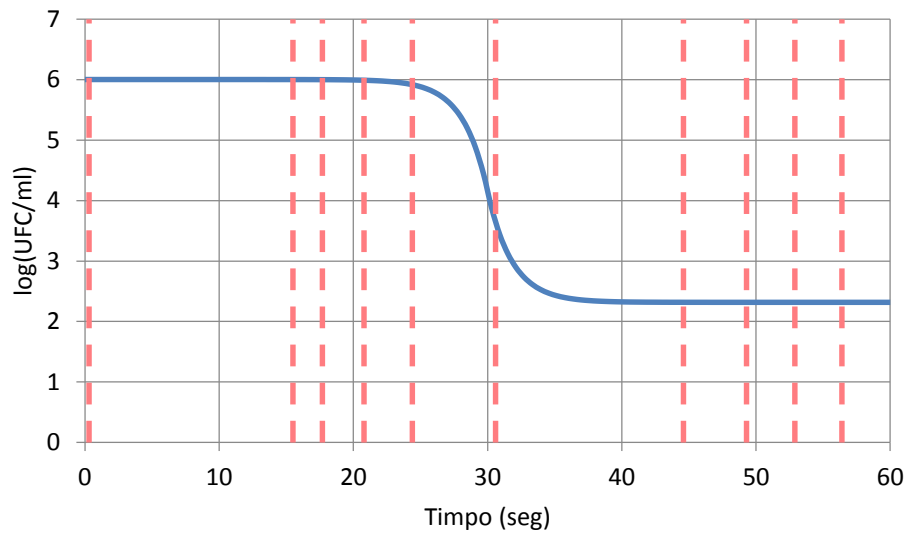


Figura 28. Soluciones criterio E modificado para el perfil triangular

Por otro lado, cabe destacar que a lo largo del experimento se observa una saturación de puntos, es decir se observa que hay puntos que se colocan de forma prácticamente aleatoria pues se trata de observaciones que aportan poca información.

## 5 Conclusiones

La información obtenida en el proceso de toma de datos experimentales debe aportar la mayor cantidad de información con objeto de minimizar la incertidumbre de los parámetros de los modelos matemáticos que describen el proceso estudiado, proporcionando así predicciones lo más fiables posibles, con el consiguiente ahorro de tiempo y recursos en futuras operaciones. Esta reducción de la incertidumbre es especialmente importante cuando entran en juego aspectos como el de la seguridad alimentaria. Un ejemplo claro son los procesos de inactivación de patógenos en alimentos.

En este trabajo se ha abordado el diseño óptimo de experimentos de un proceso de inactivación microbiológico aplicable a la industria alimentaria. La primera parte del trabajo consistió en estudiar el entorno de programación R para poder desarrollar las simulaciones que permiten obtener un diseño óptimo de experimentos.

La segunda parte del trabajo consistió en abordar el problema del diseño óptimo de experimentos para inactivación. El microorganismo estudiado ha sido *L. monocytogenes*, un microorganismo de gran interés debido al riesgo para la salud pública que entraña. Para las simulaciones se utilizó el modelo de Weibull-Mafart, con los parámetros ajustados por medio de los datos experimentales obtenidos por el Departamento de Ingeniería de los Alimentos y el Equipamiento Agrícola de la Universidad Politécnica de Cartagena

Se seleccionaron dos perfiles de temperatura diferentes, uno con forma de rampa constante y otro triangular, ambos comúnmente utilizados para la caracterización de la respuesta de poblaciones microbianas frente a tratamientos térmicos de inactivación. El diseño óptimo se realizó aplicando los criterios D y E modificado. El primero se eligió por ser el más comúnmente utilizado, mientras que el segundo por ser el recomendado en la bibliografía..

El procedimiento utilizado para el diseño óptimo se basa en la Matriz de Información de Fisher (FIM) que, a su vez, requiere el cálculo de las funciones de sensibilidades locales. Estas se han estimado por medio de diferencias finitas usando el paquete FME de R. Estas funciones permiten:

- Conocer la influencia de cada parámetro en el modelo.
- Predecir el comportamiento del modelo.

A partir de estas funciones, se determinó la identificabilidad global *a priori*. Los resultados mostraron que el modelo seleccionado, para los parámetros nominales elegidos, podría presentar una mala identificabilidad estructural.

Tras el análisis de sensibilidad se obtuvieron los primeros resultados para el diseño de experimentos (con 10 observaciones) que permitieron conocer la distribución de puntos para cada uno de los dos perfiles de temperatura, según el criterio D y E modificado. Los resultados para ambos criterios son similares, a pesar de que el criterio E modificado tiende a repartir más los puntos a lo largo de todo el tiempo. Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron soluciones óptimas no reproducibles en un laboratorio para este tipo de experimentos, donde se estima que el intervalo de tiempo mínimo entre dos observaciones debería ser de al menos 3 segundos. Este problema fue solventado reformulando el problema con una restricción y haciendo uso de una función de penalización aplicada a las soluciones que violan dicha restricción.

Tras el análisis de los resultados se observa que los dos criterios estudiados nos llevan al mismo diseño de experimentos para cada perfil aunque entre ambos se observan algunas diferencias significativas. Para el criterio D obtenemos soluciones más concentradas en las zonas sensibles y estables en comparación con el criterio E modificado que reparte más los puntos a lo largo del experimento.

Los resultados obtenidos en este trabajo están siendo aplicados por el Departamento de Ingeniería de los Alimentos y el Equipamiento Agrícola de la Universidad Politécnica de Cartagena para generar nuevos experimentos y volver a estimar los parámetros, pudiendo repetirse el ciclo posteriormente si fuera necesario, obteniendo así valores mucho más fiables para los parámetros.

Como **trabajo futuro**, una continuación natural del presente trabajo podría extenderse a:

- Uso de diferentes modelos de inactivación: Bigelow, Peleg, etc...
- Aplicación a más microorganismos y/o medios de cultivo.
- Uso de otros criterios para DOE.
- Considerar distintos perfiles de temperatura para obtener menores correlaciones entre los parámetros del modelo utilizado.

- Reducir el número de observaciones a realizar para estudiar si el número de las mismas tiene un efecto significativo sobre la amplitud de los intervalos de confianza de los parámetros, pudiendo así reducir el costo del proceso global.
- Una vez se obtenga una estimación de los parámetros suficientemente fiable, plantear problemas de optimización multiobjetivo donde se optimicen a la vez criterios contrapuestos como gasto de energía de calentamiento frente a propiedades nutricionales u organolépticas del alimento considerado.

## 6 Bibliografía

- Banga, J., & Balsa-Canto, E. (2008). Parameter estimation and optimal experimental design. *Essays Biochem*, 195-210.
- Belisle, C. J. (1992). Convergence theorems for a class of simulated annealing algorithms. *Rd. J. Applied Probability*, 29, 885–895.
- Bigelow, W. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal Infectious Disease*(29), 528-536.
- Box, G. P. (1976). Science and Statics. *Journal of the American Statistical Assotation*, 71: 791-799.
- Byrd, R. H., Nocedal, L. P., & Zhu, C. (1995). A limited memory algorithm for bound constrained optimization. *SIAM J. Scientific Computing*, 16, 1190–1208.
- Corradini, M., Normand, M., & Peleg, M. (2010). Stochastic and deterministic model of microbial heat inactivation. *J Food Sci.*, 59-70.
- Datta, A. (2016). Toward computer aided food engineering: Mechanistic frameworks for evaluation of product, quality and safety dureing processing. *Journal of Food Engineering* 71, 9-27.
- Deak, T. (2013). Food Safety Management: Chapter 17. Thermal Treatment. Academic Press.
- Dubos, R. (1998). Pasteur and modern science. . *American Society of Microbiology*.
- Fernando, P.-R., & Antonio, V. (2013). Predictive Microbiology in Foods. Springer. doi:ISBN: 978-1-4614-5519-6
- FSAI, F. S. (2005). The control and management of. *FSAI*.
- Garre, A., Fernandez, S. P., & Egea, J. A. (2016). bioinactivation: Software for modelling microbial inactivation. *The Comprehensive R Archive Network*.
- Geeraerd, A., Valdramidis, V., & Van Impe, J. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*(102), 95-105.
- Karline, S., Thomas, P., & R. Woodrow, S. (2010). Solving Differential Equations in R: Package deSolve. *Journal of Statistical Software*, 33(9), 1-25.
- Kramer, O. (2010). A Review of Constraint-Handling Techniques for Evolution Strategies. *Applied Computational Intelligence and Soft Computing*, 11.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*(72), 107–113.
- Muenchen, R. A. (19 de Abril de 2016). The Popularity of Data Analysis Software. *r4stats*. Obtenido de <http://r4stats.com/articles/popularity/>
- Murray, E., Webb, R., & Swann, M. (1926). "A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.)". *J. Pathol. Bacteriol.*

- Nicolas Appert, P. (1810). *L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animale*.
- Nocedal, J., & Wright, S. (2006). Numerical Optimization. Springer. doi:ISBN 978-0-387-40065-5
- Palop Gómez, A. (2014). *Cinéticas de inactivación de microorganismos*. Cartagena: UPCT.
- Peleg, M., & Cole, M. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*(38), 353-380.
- R-Core Team. (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Obtenido de <http://www.R-project.org/>
- Rodríguez-Fernández, M. (2006). *Modelado e identificación de bioprocesos*. Vigo: Universidad de Vigo.
- Ruiz Gómez, J. (2016). *Microbiología General*. Murcia: UCAM.
- Sablani, S. S., Datta, A., Rahman, M., & Mujumdar, A. (2006). *Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques*. CRC Press.
- Siddiqui, M. W., & Rahman, M. S. (2015). Minimally Processed Foods. Springer. doi:ISBN 978-3-319-10677-9
- Soetaert, K. (2009). rootSolve: Nonlinear root finding, equilibrium and steady-state analysis of ordinary differential equations. *R-package version 1.6*.
- Soetaert, K., & Petzoldt, T. (2015). A Flexible Modelling Environment for Inverse Modelling. *The Comprehensive R Archive Network*.
- Uryasev, S., & Pardalos, P. M. (2001). *Stochastic Optimization*. Kluwer Academic Publisher.
- Walter, E., & Pronzato, L. (1997). Identification of parametric models from experimental data. *Springer*.
- Wong, W. K. (1994). Comparing robust properties of A, D, E and G-optimal designs . *Computational Statistics & Data Analysis*, 441-448.



## 7 Apéndices

### A. Código para el ajuste de los datos isotermos

```
## Load libraries

library(bioinactivation)
library(dplyr)

##
## Attaching package: 'dplyr'
##
## The following objects are masked from 'package:stats':
##
##   filter, lag
##
## The following objects are masked from 'package:base':
##
##   intersect, setdiff, setequal, union

library(ggplot2)

source("import_results_v1-0-0.R")

## Import the results

all_results<- import.results("./data/")

## [1] "57p5_a.txt"
## [1] "57p5_b.txt"
## [1] "60_a.txt"
## [1] "60_b.txt"
## [1] "62p5_a.txt"
## [1] "62p5_b.txt"

names(all_results) <- c("time", "N", "log.UFC", "temp",
"experiment_name")

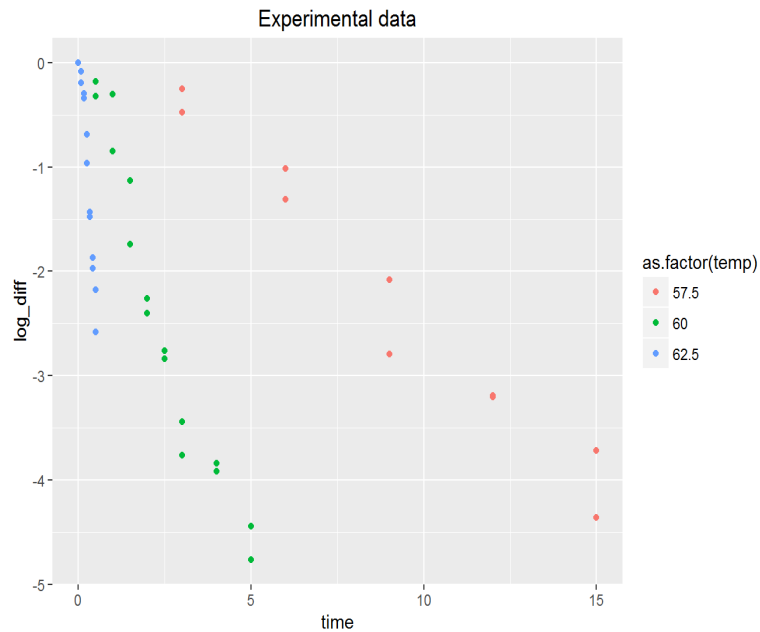
initial_counts<- all_results %>%
group_by(experiment_name) %>%
summarize(log.UFC.0 = max(log.UFC))

all_results<- merge(all_results, initial_counts)
```

```
all_results<- mutate(all_results, log_diff = log.UFC - log.UFC.0,
  experiment_name = as.factor(experiment_name))
```

```
## Plot of the data imported
```

```
ggplot(all_results) +
  geom_point(aes(x=time, y=log_diff, colour=as.factor(temp))) +
  ggtitle("Experimental data")
```



```
## Make the adjustment
```

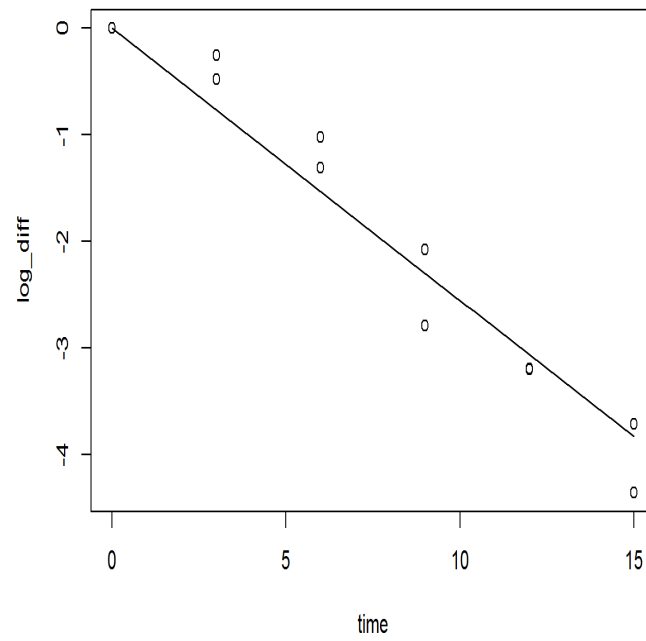
```
starting_point<- list(delta_ref = 5, z = 10, p = 1)
known_params<- list(temp_ref = 57.5)
```

```
fit_results<- fit_isothermal_inactivation("Mafart", all_results,
  starting_point,
  known_params)
```

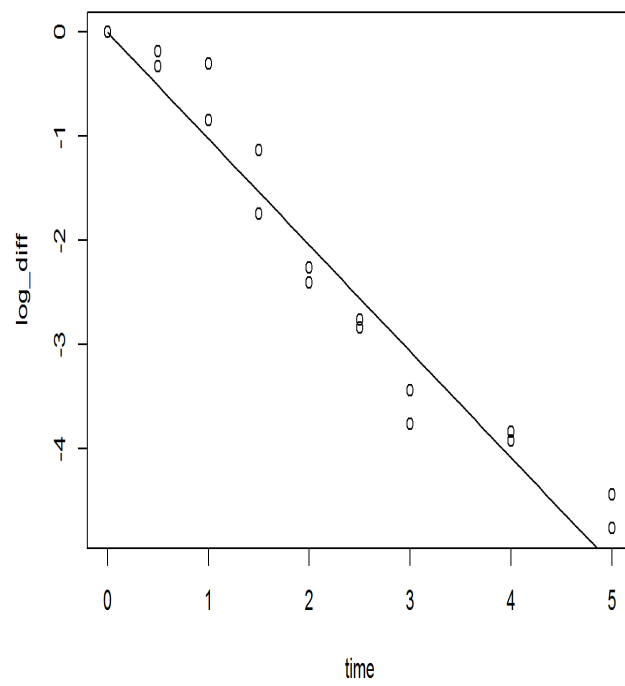
```
## Results
```

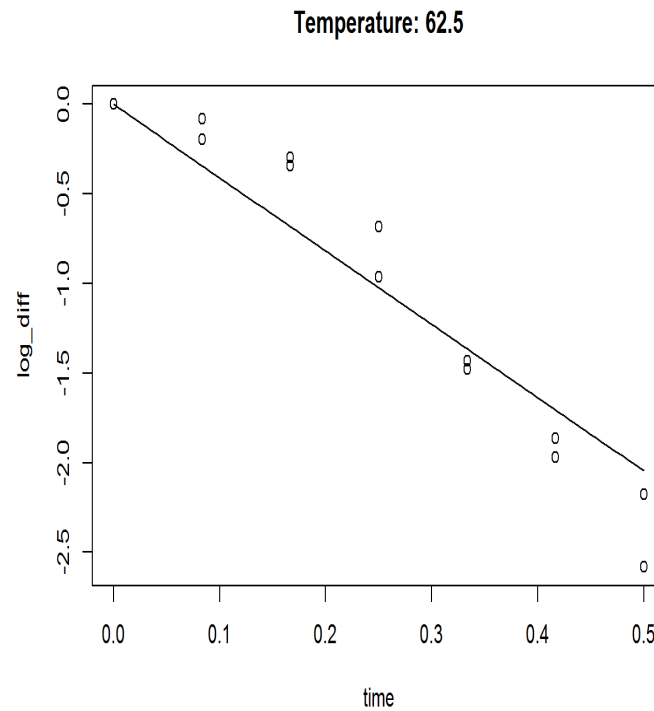
```
plot(fit_results)
```

Temperature: 57.5



Temperature: 60





```
summary(fit_results)
```

```
##
## Formula: log_diff ~ WeibullMafart_iso(time, temp, delta_ref, z, p,
temp_ref)
##
## Parameters:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## delta_ref  3.91079    0.30153   12.97 4.24e-16 ***
## z          4.15107    0.11707   35.46 < 2e-16 ***
## p          0.99862    0.05244   19.04 < 2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.3367 on 41 degrees of freedom
##
## Number of iterations to convergence: 8
## Achievedconvergencytolerance: 7.345e-06
```

**B. Código para el diseño óptimo de experimentos.**

```

#*****
# Purpose      : Diseño experimentos para el microorganismo de la
Lysteria
# Assumptions : UPCT
# Author      : Jose Lucas Peñalver Soto
# Languages   : R
#*****
set.seed(91712)

##-----
##Cargamos librerias
##-----
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(FME)
library(tidyr)
library(bioinactivation)

##-----
##Declaración de parámetros
##-----
t_max<-60#Tiempo máximo para el experimento en segundos
n_points<-10#Número de medidas que hacemos en cada experimento
n_exp<-100#Número de simulaciones que hacemos con el diseño
deexperimentos
time_min<-3#Tiempo mínimo para tomar muestras

times<-seq(0, t_max, length=100)

#Perfil de temperatura 1
temp_profile1 <-data.frame(time=c(0, 60),
temperature=c(30, 60)
)

#Perfil de temperatura 2
temp_profile2 <-data.frame(time=c(0, 30, 60),
temperature=c(30, 60, 30)
)

parms_fix<-c(temp_ref=57.5)#Parámetros fijos del modelo

```

```

model_parms<-c(delta_ref=3.9,                                     #Perfil
de temperatura 1
                z =4.2,
                p =1,
                N0 =1e6
)
temperature_profile<-temp_profile1
#Elegimos el perfil de temperatura para el diseño>

##-----
##funciones que caracterizan el modelo
##-----

#Predicción del modelo
solveN<-function(model_parms, times, temperature_profile, parms_fix){
example_model<-"Mafart"
prediction_results<-predict_inactivation(example_model, times,
c(model_parms, parms_fix), temperature_profile)

return(prediction_results$simulation[,1:3])

}

#Sensibilidad del modelo

SnsN<-sensFun(func=solveN, parms=model_parms, parms_fix=parms_fix,
times=times,
temperature_profile=temperature_profile, varscale=1, parscale=1)

##-----
##Parámetros y funciones necesarias para el diseño>
##-----

#Definición para el criterio D
det_FIM<-function(times, temperature_profile, time_points, SnsN){

sensitivities<-as.data.frame(SnsN)%>%filter(., var=="N")
delta_interp<-approxfun(sensitivities$x, sensitivities$delta_ref, rule
=2)

```

```

z_interp<-approxfun(sensitivities$x, sensitivities$z, rule =2)
p_interp<-approxfun(sensitivities$x, sensitivities$p, rule =2)

time_sensitivities<-data.frame(delta =delta_interp(time_points),
                                z =z_interp(time_points),
                                p =p_interp(time_points))

time_sensitivities<-as.matrix(time_sensitivities)
  FIM <-t(time_sensitivities)%*%time_sensitivities
return(-det(FIM))

}
#Definición para el criterio E_modificado
criterio_Emod<-function(times, temperature_profile, time_points,
SnsN) {

sensitivities<-as.data.frame(SnsN)%>%filter(., var=="N")
delta_interp<-approxfun(sensitivities$x, sensitivities$delta_ref, rule
=2)
z_interp<-approxfun(sensitivities$x, sensitivities$z, rule =2)
p_interp<-approxfun(sensitivities$x, sensitivities$p, rule =2)

time_sensitivities<-data.frame(delta =delta_interp(time_points),
                                z =z_interp(time_points),
                                p =p_interp(time_points))

time_sensitivities<-as.matrix(time_sensitivities)
  FIM <-t(time_sensitivities)%*%time_sensitivities
val_prop<-eigen(FIM, only.values=TRUE)
if(min(val_prop$values)==0) {
return(10e6)
}
else{
return(-abs(max(val_prop$values)/min(val_prop$values)))
}

}

#Función de penalización

```

```

penalty2 <-function(time_min, time_points){

sorted_times<-sort(time_points)
differences<-diff(sorted_times)
min_diff<-min(abs(differences))

if(time_min>=min_diff){
results<-1e15
}
else{

results<-exp(1/(min_diff-2.97105))-1
}

return(results)
}

#Inicialización parámetros para el diseño intervalos predefinidos

points<-matrix(nrow=n_exp, ncol=n_points)

for(i in 1:n_exp){
for(j in 1:n_points){
points[i,j]=runif(1,min=(j-1)*t_max/n_points, max=j*(t_max/n_points)-
time_min)
}
}

t_min<-matrix(nrow=n_exp, ncol=n_points)
value<-c(1:n_exp)
convergence<-c(1:n_exp)
message<-c(1:n_exp)

#Funciones de coste
Coste_D<-function(time_min, time_points,times, temperature_profile,
SnsN){
return(1e15*penalty2(time_min, time_points)+det_FIM(times,
temperature_profile, time_points, SnsN))
}

```



```

Coste_E<-function(time_min, time_points,times, temperature_profile,
SnsN){
return(penalty2(time_min, time_points)+criterio_Emod(times,
temperature_profile, time_points, SnsN))
}

##-----
##Diseño de experimentos
##-----
for(i in1:n_exp){
tmin<-optim(par=points[i,], fn=Coste_D , times=times,
time_min=time_min,
temperature_profile=temperature_profile,
SnsN=SnsN, gr=NULL, method ="L-BFGS-B", lower=0, upper=t_max)
t_min[i,]=tmin$par
value[i]=tmin$value
convergence[i]=tmin$convergence
message[i]=tmin$message
}

head(t_min)
head(value)
head(convergence)

#Calculo de porcentaje de
sum<-0
for(iin1:length(convergence)){
if(convergence[i]==0){
sum<-sum+1
}
}
porcentaje<-sum*100/(length(convergence))

#Representación gráfica
tiempos<-as.data.frame(t_min)
datos<-gather(tiempos)
ggplot(datos, aes(value))+geom_density()

exp<-c(1:n_exp)
datos<-data.frame(tiempos, exp)

```

```
datos2<-gather(datos, exp)
ggplot(datos2, aes(x=value, y=exp))+geom_point()+labs(x="times (min)",
y="simulationnumber")
```